Aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. M. Arnold

Die Differenzierung mesenchymalen Gewebes der Extremitätenknospe des Hühnchens in der Rollerkultur -Behandlung mit cholinergen Substanzen-

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
GERHARD REINHOLD WETZIG
aus Jugenheim a.d.Bergstraße

1984

UCLA
LIBRARY

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. M. Arnold

Die Differenzierung mesenchymalen Gewebes der Extremitätenknospe des Hühnchens in der Rollerkultur -Behandlung mit cholinergen Substanzen-

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
GERHARD REINHOLD WETZIG
aus Jugenheim a.d.Bergstraße

1984

Dekan:	*Professor Dr. med. G. Fichtner*
1. Berichterstatter:	*Professor Dr. med. U. Drews*
2. Berichterstatter:	*Professor Dr. med. H.- J. Ruoff*

---

gedruckt bei H.- J. Köhler · Reprografischer Betrieb · Tübingen

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Professor Dr. U. Drews erstellt.
Mein Dank gilt ihm besonders dafür, daß er an der Durchführung der Experimente sowie am Fortgang der Arbeit und an der Auswertung der Ergebnisse mit stetem Interesse und ausführlichen Diskussionen Anteil nahm.

Mein herzlicher Dank für die hilfsbereite Unterstützung gilt auch Frau A. Show-Klett sowie den anderen Mitarbeitern des Anatomischen Institutes Tübingen, die an meiner Arbeit beteiligt waren.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis:

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	6
2.1.	Herstellung der Zellsuspension	6
2.2.	Das Kulturverfahren	8
2.3.	Pharmakologische Behandlung	11
2.4.	Verwendete Materialien und Lösungen	11
3.	Befunde	13
3.1.	Allgemeiner Kulturverlauf	13
3.1.1.	Rollerkulturen ganzer Extremitätenknospen mit Ektodermhülle	13
3.1.2.	Rollerkulturen ganzer Extremitätenknospen ohne Ektodermhülle	16
3.1.3.	Rollerkulturen einer mesenchymalen Zellsuspension	20
3.1.4.	Rollerkulturen einer mesenchymalen Zellsuspension und anschließender Weiterinkubation in einprozentigem Agar-Medium	31
3.2.	Pharmakologische Behandlung	36
4.	Diskussion	39
4.1.	Entwicklungsverlauf ganzer Extremitätenknospen in der Rollerkultur	40
4.1.1.	Extremitätenknospen mit Ektodermhülle	40
4.1.2.	Extremitätenknospen ohne Ektodermhülle	40
4.1.3.	Behandlung mit cholinergen Substanzen	41
4.2.	Entwicklungsverlauf einer mesenchymalen Zellsuspension in der Rollerkultur	44
4.2.1.	Allgemeiner Kulturverlauf	44
4.2.2.	Behandlung mit cholinergen Substanzen	47
5.	Zusammenfassung	49
6.	Literaturverzeichnis	51
7.	Lebenslauf	54

1. Einleitung

In der Embryonalentwicklung erscheint vorübergehend eine Cholinesterase-Aktivität in Zellen, die an Gestaltungsbewegungen beteiligt sind. Die Cholinesterase-Aktivität wurde erstmals von DREWS et al. (1967) in einer histochemischen Untersuchung während der Frühentwicklung der Hühnerkeimscheibe beschrieben. Zellen, die Bewegungen zur Ausbildung einer Organanlage durchführen, zeigen vorübergehend Cholinesterase-Aktivität. Nach Ausbildung der Organanlage ist keine Enzymaktivität mehr nachweisbar. Um den Unterschied zu der in der neuromuskulären Verbindung und im Serum vorkommenden Cholinesterase aufzuzeigen, nannte DREWS (1975) das hier vorübergehend auftretende Enzym "Embryonale Cholinesterase". Inzwischen konnte embryonale Cholinesterase auch in der Embryonalentwicklung von Seeigeln (OZAKI 1974, 1976), Fischen (Oryzias latipes; FLUCK 1978) und der Seescheide (Ciona intestinalis; MINGATI und FALUGI, 1980) nachgewiesen werden.

Auch im Mesoderm der Extremitätenknospe des Hühnchens tritt während der Abgrenzung von Knorpel- und Muskelanlagen Cholinesterase-Aktivität auf (DREWS u. DREWS, 1972). Ab Stadium 20 (Stadieneinteilung nach HAMBURGER u. HAMILTON, 1951) breitet sich im Mesoderm der Extremitätenknospe Cholinesterase-Aktivität von proximal nach distal aus, die mit einer Vaskularisation und Auflockerung des Gewebes verbunden ist. In der Auflockerungszone verdichten sich die Cholinesterase-positiven Zellen zu einem zentralen Kern aus knorpelbildendem Gewebe. Die zentrale Verdichtung verstärkt und vergrößert sich bis zu Stadium 24, begleitet von einer Aktivitätssteigerung der beteiligten Mesenchymzellen. Ab Stadium 25 treten erstmals peripher stark aktive Myoblasten auf. Proximal grenzt sich die Anlage für den Humerus (bzw. Femur) scharf ab. Im Stadium 27 wird die Cholinesterase-Aktivität in den zentralen Regio-

nen der Skelettelemente schwächer. Anlagen für Radius und Ulna (bzw. Tibia und Fibula) sind bereits vorhanden. Aus einkernigen Myoblasten entwickeln sich ungeordnete Netze aus mehrkernigen Muskelschläuchen. Im Stadium 29 haben die Knorpelanlagen der langen Knochen ihre Cholinesterase-Aktivität fast gänzlich verloren.

Das Auftreten von Cholinesterase-Aktivität bei Gestaltungsbewegungen von embryonalen Zellen weist auf ein cholinerges System hin. Zu einem cholinergen System gehören folgende Komponenten: Acetylcholin, Acetylcholinesterase, Cholin-Acetyltransferase und ein Rezeptor für Acetylcholin. Acetylcholin konnte von FLUCK (1978) in der Entwicklung von Fischembryonen (Oryzias latipes) nachgewiesen werden. Die embryonale Cholinesterase der Extremitätenknospe des Hühnchens wurde von SCHRÖDER (1980) als spezifische Acetylcholinesterase biochemisch identifiziert. SCHMIDT (1981) führte Rezeptorbindungsstudien durch, um das Vorhandensein eines Acetylcholin-Rezeptors in der Extremitätenknospe des Hühnchens aufzuzeigen. Er wies einen Rezeptor vom muscarinischen Typ nach, im Unterschied zu den Rezeptoren der Myoblasten und Muskelzellen, die nikotinischer Natur sind.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Mesenchymdifferenzierung der Extremitätenknospe des Hühnchens durch cholinerge Substanzen zu beeinflussen.

Die Wirkung cholinerger Substanzen auf die Embryonalentwicklung wurde bereits von anderen Autoren untersucht. GUSTAFSON u. TONEBY (1970) beschrieben eine Hemmung der Gastrulation in der Entwicklung des Seeigels durch Acetylcholin- und Serotoninliganden. FLUCK et al. (1980) konnten beim Medaka (ein Teleost-Fisch, Oryzias latipes) durch Zugabe von Carbamylcholin eine Zunahme der in-vitro-Aggregation embryonaler Zellen beobachten. Durch d-Tubocurarin wurde die Zellaggregation gehemmt.

Auch am Hühnchen wurde der Einfluß cholinerger Substanzen untersucht. So konnten LANDAUER (1977) und McBRIDE

(1980) teratogene Wirkungen in der Entwicklung von Hühnerembryonen *in ovo* aufzeigen. LANDAUER beobachtete nach Zugabe von Carbachol (Carbamylcholin) bzw. Neostigmin Mißbildungen der Wirbelsäule und muskuläre Unterentwicklung. Unter Einsatz von Atropin wurde von McBRIDE Gastroschisis und Mißbildungen von Hirn und Extremitäten beschrieben.

Ich habe für meine Experimente ein Rollerkultursystem verwendet, daß einerseits die ausschließliche unmittelbare Einwirkung der cholinergen Substanzen auf das zu kultivierende Gewebe gewährleistet. Andererseits entfernt sich das Kultursystem nicht zu weit von den *in-vivo*-Gegebenheiten, um noch Rückschlüsse auf die tatsächlichen Vorgänge zu erlauben. Das verwendete System entspricht weitgehend einem von MOSCONA (1961) beschriebenen Kultursystem. MOSCONA führte erstmals ausführliche Studien über die Reaggregationsfähigkeit embryonaler Zellen in rotierenden Schwenkkulturen durch. Hierfür wurden verschiedene embryonale Gewebe in Ca-Mg-freier Tyrodelösung und darauffolgend in Trypsinlösung inkubiert. Nach Spülung mit Ca-Mg-freier Tyrodelösung wurden die Gewebestücke in Kulturmedium überführt und anschließend mit einer feinen Pinzette disaggregiert. Jeweils 3 ml Zellsuspension wurden in 25-ml-Erlenmeyerkolben gefüllt, mit einem CO_2-Luft-Gemisch begast, dicht verschlossen und anschließend mit einem Schwenker bei konstanter Geschwindigkeit und Temperatur in einer Kreisbahn (r=1,9 cm) bewegt. Nach 24 Stunden konnte man in Abhängigkeit vom Zelltyp und den Kulturbedingungen große kompakte Zellhaufen oder zahlreiche kleinere Aggregate in einer Größe zwischen 0,3 mm und 1,5 mm Durchmesser beobachten. Die Charakteristika (Menge, Größenverteilung, Aussehen und innere Struktur) der Zellaggregate unterschiedlichen Typs bzw. Ursprungs variierten auffallend unter sonst gleichen Bedingungen. Aggregate gleichen Zelltyps bzw. Zellpopulation zeigten regelmäßig ein spezifisches Aggregationsmuster, das auch von größeren Änderungen der Zellkonzentration nicht wesentlich beeinflußt wurde. Kulturen, bei denen Zellen unterschiedlicher Gewebe, sowohl

von Mäuse-, als auch von Hühnerembryonen gemischt wurden, ergaben, daß die Zellaggregate sich unabhängig von der Tierspezies bildeten (Mosaikaggregate), nach dem Gewebetyp gruppierten und sich dabei entsprechend den in-vivo-Gegebenheiten anordneten. Größe und Verteilung der Aggregate konnten einerseits nach Rotationsgeschwindigkeit und andererseits nach der Höhe der Kulturtemperatur variiert werden.

Experimente, bei denen den Kulturen Puromycin (ein Proteinsynthesehemmer) zugesetzt wurde (MOSCONA u. MOSCONA, 1966) führten zu einer Hemmung der Aggregation und der Haufenbildung. Dies läßt den Schluß zu, daß Proteine der Zelloberfläche, die bei der Disaggregation mit Trypsin zerstört worden waren und daher zu Beginn der Kultur wieder synthetisiert werden müssen, für die Reaggregation verantwortlich sind.

Die Trennung unterschiedlicher Zellarten voneinander und die Reaggregation in histotypischer Anordnung ("sorting out") führt MOSCONA auf unterschiedliche Hafteigenschaften ("cohesiveness") der Zelloberflächen zurück.

MEDOFF (1967) untersuchte die Knorpelentwicklung der Extremitätenknospe des Hühnchens nach der Methode von MOSCONA (1961). Sie verwendete Embryonen der Stadien 19-20 (HAMBURGER u. HAMILTON, 1951; 68 bis 72 Stunden inkubiert). Die Extremitätenknospen wurden entfernt und unter Belassen der Ektodermhülle dissoziiert. Bei den Reaggregaten dieser Kulturen wurde lediglich Knorpeldifferenzierung beobachtet, jedoch keine Muskelentwicklung. Nach 48 Stunden Kulturdauer zeigten histologische Präparate in Hämatoxylin-Eosin- bzw. Toluidinblau-Färbung in den Aggregaten dicht liegende, abgerundete Mesenchymzellen mit Mitosen. Ein schwacher Saum metachromatischer Knorpelgrundsubstanz konnte bereits in einigen Fällen im Zentrum der größeren Aggregate beobachtet werden. Nach 72 Stunden nahmen diese metachromatischen Knorpelzonen zu, wobei sich die dazwischenliegenden

Zellen zu konzentrischen Kreisen anordneten, bis nach 144 Stunden eine komplette metachromatische Matrix die Zellen umgab. Die größten Veränderungen der Matrix ereigneten sich zwischen 96 und 120 Stunden nach Kulturbeginn. Da in der intakten Extremitätenknospe Knorpelgrundsubstanz ab Stadium 25 (etwa 108 Stunden inkubiert) auftritt, ergibt sich daraus eine Verlangsamung der Entwicklung in der Kultur im Vergleich zur in-vivo-Entwicklung von etwa 10 bis 20 Stunden.

Im Unterschied zu MOSCONA und MEDOFF verwendete ich für meine Experimente keine 25-ml-Erlenmeyerkolben, die horizontal geschwenkt wurden, sondern ein Vertikal-Roller-System. Hierbei treten die von MOSCONA (1961) beschriebenen Scherkräfte weniger stark in Erscheinung.

MOSCONA ging in seinen Untersuchungen über das "sorting-out"-Verhalter von zwei verschiedenen Zelltypen aus. Bei meinen Kulturen verwendete ich in der Regel ausschließlich Mesenchymzellen, um dann die Differenzierung zu Knorpel- und Muskelzellen, sowie deren "sorting out" zu beobachten.

Eine solche Differenzierung zu Knorpel- und Muskelzellen wurde von MEDOFF (1967), die ja auch von undifferenzierten Mesenchymzellen ausging, nicht beschrieben. Sie beobachtete lediglich die Differenzierung zu Knorpelgewebe.

Das Auftreten von Muskelzellen und deren parallele Anordnung zu Muskelsträngen konnte in der vorliegenden Arbeit bei fast allen Versuchen nachgewiesen werden.

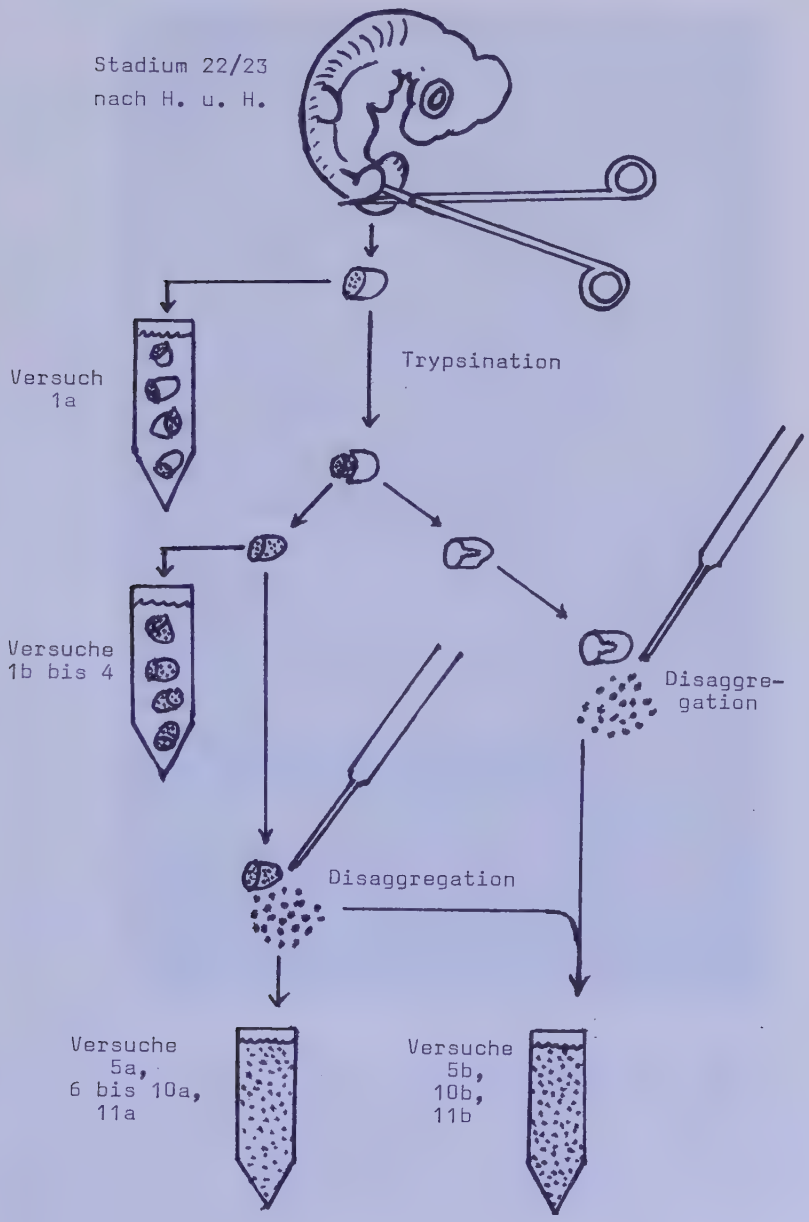
2. Material und Methoden

Verwendete Materialien und Lösungen sind entsprechend den in Klammern gesetzten Zahlen unter 2.4. näher erläutert.

2.1. Herstellung der Zellsuspension

Befruchtete Hühnereier wurden vom Schloßgut Laupheim bei Ulm geliefert. Die Eier wurden 3 1/2 Tage in einem Ehret-Inkubator (KMB 2) mit Wendevorrichtung bei 37,8°C bebrütet. Hühnerembryonen der Stadien 22/23 (HAMBURGER u. HAMILTON, 1951) wurden den Eiern entnommen und in sterile Tyrode-Lösung (1) übertragen. Die weitere Bearbeitung wurde unter sterilen Bedingungen am Lamina-Flow (Envirco von Ceag Schirp Reinraumtechnik) mit Hilfe von Stereomikroskopen vorgenommen. Alle Extremitätenknospen wurden an der Basis abgeschnitten und jeweils etwa 30 Stück in einem Grobsteinschälchen mit Tyrode-Lösung gesammelt. Jedes Schälchen wurde zweimal mit Ca-Mg-freier Hanks-Lösung (2) gespült. Anschließend wurden die Knospen in eine Trypsin-Pankreatin-Lösung (3) überführt und im Kühlschrank bei 4°C 45 bis 60 Minuten lang inkubiert. Nachdem sich der Zellverband der Knospen durch Einwirkung der Trypsin-Pankreatin-Lösung gelockert hatte, wurden die Ektodermhüllen mittels Haarkapillaren, deren Durchmesser dem der Extremitätenknospen etwa entsprach (Ø ca. 1 mm), durch Auf- und Niedersaugen vom mesenchymalen Kern gelöst. Anschließend wurden die Ektodermhüllen mit feinen Pinzetten abgezogen und zusammen mit der Trypsin-Pankreatin-Lösung aus dem Grobsteinschälchen entfernt. Für Kulturen, denen Ektodermzellen zugesetzt werden sollten, wurden die Hüllen gesammelt. Den verbleibenden Mesenchymkernen wurde etwa fünf Minuten lang zur Inaktivierung der Trypsin-Pankreatin-Wirkung ein Pferdeserum (4)-Kulturmedium (5)-Gemisch (Verhältnis 1 : 1) zugegeben und nachfolgend in reines Kulturmedium überführt. Während bearbeitungsbedingter

Abb. 1 Die verschiedenen Kulturverfahren



Verzögerungen wurden die Schalen bei 37°C, 5% CO_2-Spannung und 95% Luftfeuchtigkeit im Inkubator (Heraeus Typ 5060) gelagert.

Falls für den jeweiligen Versuch nicht die ganzen Mesenchymkerne benötigt wurden, erfolgte jetzt die Disaggregation mit mehreren Haarkapillaren absteigenden Lumens (Ø 0,2 bis 0,1 mm). Die resultierende Feinzellsuspension wurde nach weiterer Kulturmediumzugabe in eine Spritze aufgezogen und durch ein Nylonnetzfilter (6) in ein Spitzglas gedrückt. Die Zellsuspension wurde mit fetalem Kälberserum (7)/Kulturmedium-Gemisch (Verhältnis 1:1) unterschichtet und bei 400 U/min 30 Minuten lang zentrifugiert. Nach Abziehen des Überstandes wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert, in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und durch Zugabe weiteren Mediums die für den jeweiligen Versuch benötigte Verdünnung hergestellt. Zur Verdeutlichung der verschiedenen Bearbeitungswege siehe Abb.1.

2.2. Das Kulturverfahren

Für das weitere Kulturverfahren wurde je nach Experiment 1 bis 3 ml Zellsuspension in gasdurchlässige Beutel aus Heraeus-Biofolie eingeschweißt, die 1 cm breit und 5 cm lang waren (siehe Abb. 7). Bei Versuchen mit ganzen Extremitätenknospen wurden diese mit 2 ml Kulturmedium in die Beutel gegeben. Für die pharmakologischen Untersuchungen wurden die jeweiligen Substanzen vorher in die Folienbeutel pipettiert. Die Beutel wurden, um ein kontinuierliches und möglichst ruckfreies Rollen zu gewährleisten, in Kunststoffreagenzgläser gesteckt. Der Rollvorgang wurde mittels einer über Kette elektrisch angetriebenen vertikalen Scheibe durchgeführt, auf die 15 auf einer Seite offene Trommeln (Ø 4,5 cm) in einem Abstand von 12 cm vom Drehpunkt der Scheibe montiert waren. Die Trommeln waren mit der Grundfläche auf der Scheibe befestigt, so daß die Achse der Trommeln der Drehachse parallel war. In diese

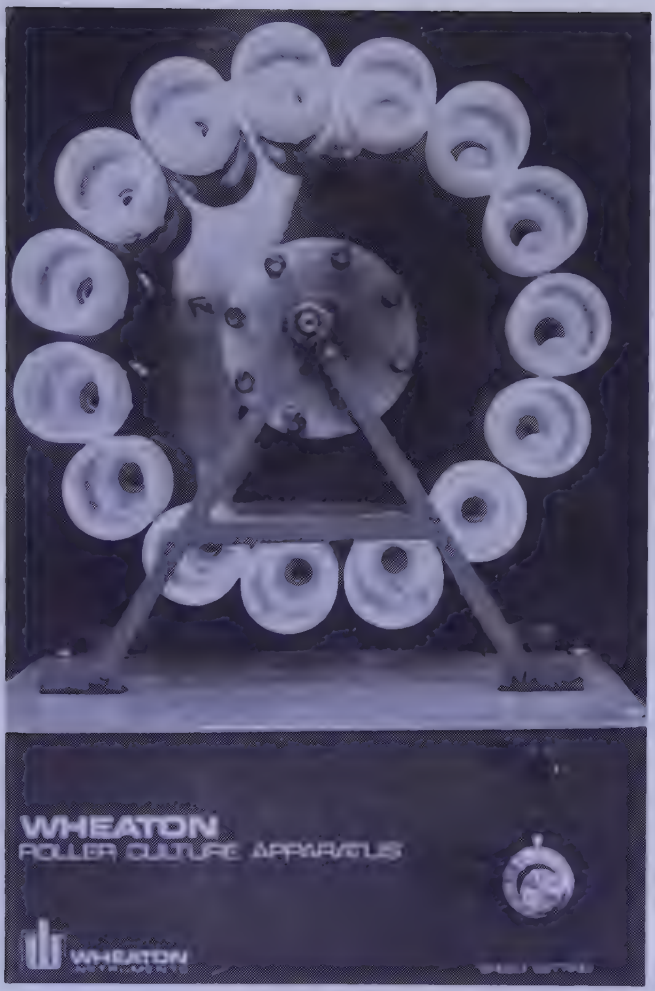


Abb. 2: Rollapparatur. Die Folienbeutel mit der Zellsuspension wurden in die kleinen Kunststoffreagensgläser gegeben.

offenenTrommeln wurden nun die Kunststoffreagenzgläser gelegt, die nun innerhalb der Trommeln, bedingt durch deren Bewegung auf der großen Kreisbahn, um ihre eigene Achse rollten. Als Antriebsgerät diente ein Wheaton-Roller-Culture-Apparatus (Abb.2). Die Drehgeschwindigkeit der großen Scheibe betrug 1,5 U/min (Stufe 4), was einer Eigenrotation der Reagenzgläser und damit der Kulturbeutel von 5 U/min entspricht. Die gesamte Rollapparatur stand in einem NAPCO-Inkubator Modell 322 bei 37°C, 5% CO_2-Spannung und 95% Luftfeuchtigkeit. Da dem Kulturmedium Phenolrotlösung als Indikator zugesetzt worden war, konnte der pH-Wert (7,2) der Kulturen kontrolliert werden. Je nach Versuchsplanung wurden die Kulturen ein bis sechs Tage im Inkubator gerollt. Nach Abbruch der Kultur wurden die Aggregate bzw. Extremitätenknospen unter dem Stereomikroskop (Zeiss IVb) beurteilt und mit einer Contax RTS Kleinbildkamera mit Mikroskop-Adapter photographiert. Anschließend wurden die Aggregate bzw. Extremitätenknospen fixiert, indem sie mit Tyrode-Lösung gespült, eine Stunde in Formalin-Calcium-Lösung nach BAKER (8) bei 4°C fixiert und dann zweimal je fünf Minuten mit eisgekühltem Aqua dest gewässert wurden. Danach wurden die Aggregate bzw. Extremitätenknospen zur Anfärbung der Cholinesterase-aktiven Regionen nach der Methode von KARNOVSKY u. ROOTS (1964) gefärbt. Die Inkubationszeit betrug fünf Stunden, wobei nach der Hälfte der Zeit die Lösung gewechselt wurde. Zum Nachweis von Knorpel wurde eine Metachromasie-Färbung mit Toluidinblau nach ROMEIS (1968) bzw. eine Metachromasie-Färbung nach TOEPFER (1970) mit 1,9-Dimethylmethylenblau-Lösung (9) durchgeführt. Ein Teil der Aggregate wurde zum Anfertigen von Paraffin-Schnitten nach der Methode von BOUIN (ROMEIS, 1968) fixiert.

Die Beurteilung der Totalpräparate wurde am Stereomikroskop Zeiss IVb vorgenommen. Die histologischen Schnitte wurden mit einem Zeiss-Photomikroskop III ausgewertet und photographiert. Auch die Totalpräparate wurden mit Hilfe des Zeiss-Photomikroskopes dokumentiert.

2.3. Pharmakologische Behandlung

Die verwendeten cholinergen Substanzen (10) wurden vor Abfüllen der Zellsuspension bzw. des Kulturmediums in die Beutel pipettiert. Die Pharmaka wurden zuvor in Tyrode-Lösung gelöst und durch Filtration (11) sterilisiert.

2.4. Verwendete Materialien und Lösungen

1. Tyrode-Lösung
   NaCl 8,00 g/l, KCl 0,20 g/l, $CaCl_2$ 0,20 g/l,
   $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,10 g/l, $NaHCO_3$ 1,00 g/l,
   $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 0,05 g/l, Glucose 1,00 g/l
   pH-Einstellung auf 7,2 - 7,3

2. Ca-Mg-freie Hanks-Lösung
   NaCl 8,00 g/l, KCl 0,40 g/l, $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ 0,06 g/l,
   KH_2PO_4 0,06 g/l, Glucose 1,00 g/l, $NaHCO_3$ 0,35 g/l
   pH-Einstellung auf 7,2-7,3

3. Trypsin-Pankreatin-Lösung
   2,25 % Trypsin (Fa. Difco, 1:250)
   0,75 % Pankreatin (Fa. Difco)
   in Ca-Mg-freier Hanks-Lösung bei 37°C gelöst.

4. Pferde-Serum der Fa. Seromed

5. Kulturmedium
   88,5 ml MEM Dulbecco einfach ohne Glutamin plus 3,7 g/l $NaHCO_3$ (Fa. Seromed), 10 ml fetales Kälberserum (Fa. Seromed), 0,5 ml Penicillin-Streptomycin (50 E/ml; Fa. Difco), 1,0 ml Glutamin 5% (Fa. Difco)

6. Nylonnetzfilter
   Swinnex-Filterhalter der Fa. Millipore mit Nylonnetz der Fa. Reichelt (30 µm)

7. fetales Kälberserum der Fa. Seromed

8. Formalin-Calcium-Fixationslösung nach BAKER
   4 g Paraformaldehyd Merck, 1 g $CaCl \cdot 2H_2O$ ad 100 ml
   Aqua dest, evtl. mit NaOH-Lösung klären, pH 7,3

9. 1,9-Dimethylmethylenblau der Fa. Serva

10. Pharmaka (gelöst in Tyrode-Lösung, pH 7,2-7,3)
    Atropinum Sulfat (Fa. Merck), Carbamylcholin Hydrochlorid (Fa. Merck), Chlorpromazin (Fa. Sigma), Pilocarpinum Chlorid (Fa. Merck), Tremorin Dihydrochlorid (Fa. Sigma), Acetylcholin Chlorid (Fa. Sigma), Eserin Sulfat (Fa. Sigma).
    Die Pharmaka wurden nach dem höchst möglichen Reinheitsgrad ausgewählt.

11. Sterilisationsfilter
    Milex-GS (0,22 µm) der Fa. Millipore

3. Befunde

3.1. Allgemeiner Kulturverlauf

3.1.1. Rollerkulturen ganzer Extremitätenknospen mit Ektodermhüllen

Um die Differenzierung des Mesenchyms unter Bedingungen untersuchen zu können, die den in-vivo-Gegebenheiten weitgehend entsprachen, wurden anfangs ganze Extremitätenknospen in der Rollerkultur gezüchtet. Jeweils vier Extremitätenknospen von Hühnchen der Stadien 22-24 wurden in einen Folienbeutel eingeschweißt und zwei Tage lang im Inkubator gerollt (Tabelle 1, Versuch 1a). Nach dieser Kulturdauer zeigten die Extremitätenknospen mit großer Regelmäßigkeit eine runde bis ovale Form von etwa 1 mm Durchmesser. Über den durch das Abschneiden entstandenen Wundrändern hatte sich in allen Fällen die Ektodermhülle geschlossen, so daß überall eine glatte ebene Oberfläche vorhanden war. Der mesenchymale Kern der Extremitätenknospen zeigte in unterschiedlichem Maße Auflösungserscheinungen, die von einzelnen Aufhellungen bis hin zu vollkommen leeren Ektodermblasen reichten (Abb.3).

Die zum Nachweis von Muskelzellen und Chondroblastenkondensationen verwendete Cholinesterase-Färbung nach KARNOVSKY u. ROOTS (1964) ergab bei Extremitätenknospen, bei denen der mesenchymale Kern noch vorhanden war, eine homogene, sich über die gesamte Knospe erstreckende Färbung, ohne daß sich irgendwelche Strukturen hervorgehoben hätten.

Histologisch fand sich unter einer scharf begrenzten Epithelstruktur eine Zone lebenden Mesenchymgewebes, das jedoch von vielen nekrotischen Zellen durchsetzt war. Diese unterschiedlich breite Zone setzte sich scharf zu dem nekrotischen Zentrum ab. Unter den lebenden Mesenchymzellen war keinerlei Differenzierung feststellbar.

Tabelle 1: Versuche gleicher Ziffer wurden am gleichen Tag durchgeführt. Die Unterteilung in a und b bezieht sich auf unterschiedliche Kulturart oder Kulturdauer.

Versuch		1a	1b	2a	2b	3a	3b	4	5a	5b	6	7	8	9	10a	10b	11a	11b	12a	12b
Stadium n. HAMB. u. HAMILT.(1951)		22-24	22-24	22/23	22/23	22/23	22/23	22/23	22/23	22/23	22/23	22	22/23	23	22/23	22/23	22/23	22/23	23	23
Art der Kultur	ganze Knospen mit Ektoderm	X																		
	ganze Knospen ohne Ektoderm		X	X	X	X	X	X												
	Zellsuspension aus Mesenchym								X		X	X	X	X	X		X			
	Zellsusp. aus Mesench.+Ektod.									X						X		X		
	Zellsusp. aus ganzen Embryos																		X	X
Zellkonz. in der Susp. $\times 10^6$ Z/ml									2,4		2,0	1,3	1,9	2,9	1.8	2,7	1,8	2,7	2,4	2,4
Vol./Beutel in ml									1	1	3	2	2	1	1	1	1	1	1	1
Beutel/Versuch		7	8	7	8	7	8	15	13	2	15	4	15	15	27	3	27	3	7	8
Gesamtkulturdauer		2	2	3	5	3	6	3	1	1	2	3	3	3	2	2	5	5	1	2
davon Roller		2	2	3	5	3	6	3	1	1	2	3	3	3	1	1	1	1	1	2
davon Agar															1	1	4	4		

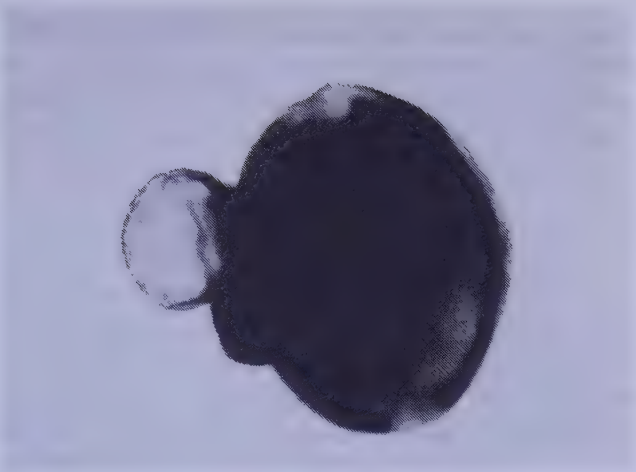


Abb. 3: Extremitätenknospe mit geschlossener Ektodermhülle nach zwei Tagen Kulturdauer. Nekrose des mesenchymalen Kerns. (Vergr. 70x)

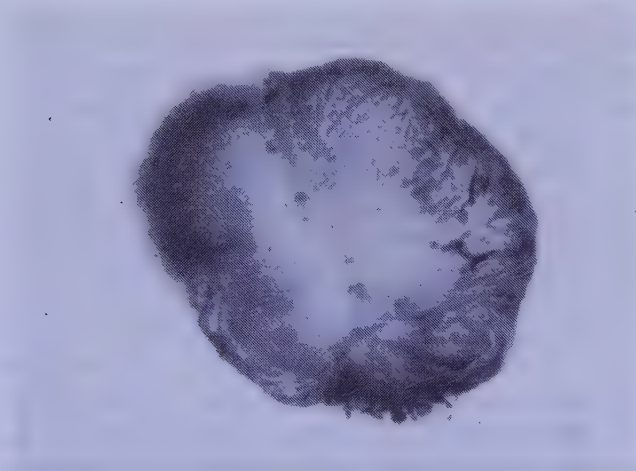


Abb. 4: Extremitätenknospe ohne Ektodermhülle nach drei Tagen Kulturdauer. Parallele Ausrichtung von Muskelspindeln an der Oberfläche. Cholinesterase-Färbung. (Vergr. 70x)

Diese Beobachtungen lassen den Schluß zu, daß die Versorgung des Mesenchymgewebes mit Nährstoffen durch die Ektodermhülle hindurch nur unzureichend ist. Die Zellen gehen entweder aufgrund des Nährstoffmangels zugrunde oder werden in ihrer Entwicklung stark behindert.

3.1.2. Rollerkulturen ganzer Extremitätenknospen ohne Ektodermhülle

Da eine Beurteilung der Differenzierung des Mesenchyms bei Extremitätenknospen unter Belassung des ektodermalen Überzugs durch die ernährungsbedingten Störungen nicht möglich war, wurden in den nachfolgenden Versuchen die Ektodermhüllen vor Kulturbeginn entfernt. Es wurden im Rahmen von vier Versuchen Extremitätenknospen in Folienbeuteln zwei, drei, fünf oder sechs Tage lang im Inkubator gerollt (Tab.1, Vers. 1b, 2a+b, 3a+b u. 4).

Für die Zwei-Tage-Kultur wurden Extremitätenknospen von Embryonen der Stadien 22-24 verwendet (Tab.1, Vers.1b). Es ergaben sich 0,5 bis 1 mm große, kugelförmige bis ovoide Gewebsklümpchen mit teils ebener, teils höckriger Oberfläche und glatter Oberflächenstruktur. In einigen Kulturen verklumpten die ursprünglichen Knospen zu großen Konglomeraten. Diese ließen jedoch die gleiche Primärstruktur erkennen, wie die einzelnen Klümpchen. Die Cholinesterase-Färbung ergab meistens homogene Aktivität mit einem Maximum über dem Zentrum. Gelegentlich fanden sich aber auch Maxima in unterschiedlichen Zellregionen.

Histologisch erkennt man ab einer Größe von 0,8- 1 mm eine zentrale Nekrose, um die eine ziemlich konstant breite Zone lebenden Mesenchymgewebes liegt. Innerhalb dieses Mesenchymgewebes lassen sich noch keinerlei Regionen unterschiedlicher Gewebsstruktur erkennen.

Bei Versuchen, die über drei Tage inkubiert wurden

(Tab.1, Vers. 2a, 3a, 4), entstanden ebenfalls kugelförmige bis ovoide Gewebsklümpchen, die jedoch wesentlich unregelmäßigere Oberflächen hatten. Der Durchmesser betrug 0,5 bis 1 mm (lange Achse), wobei jedoch die meisten Klümpchen im Bereich von 1 mm lagen. Die Oberflächenstruktur zeigte neben glatten Bereichen oft samtartiges Aussehen auf den Hökkern.

Die Cholinesterase-Färbung ergab neben einem Färbungsmuster entsprechend der 2-Tage-Kultur bei vielen Knospen ein negatives Zentrum, um das herum bis etwa 0,1 mm unter der Oberfläche eine gut abgrenzbare positive Zone zu erkennen war. Der Oberfläche aufgelagert waren sehr stark positive Zellgruppen, die in manchen Fällen zu langen dünnen Spindeln ausgewachsen waren. Mikroskopisch konnte man im Zentrum der Spindeln mehrere Kerne feststellen. Es handelte sich hier offensichtlich um Muskelzellen. Diese bildeten auf der Oberfläche oft einen ungeordneten spinnennetzartigen Überzug. Bei drei Kulturen konnte innerhalb dieser netzförmigen Muskelauflagerungen deutlich eine parallele Ausrichtung der Spindeln festgestellt werden (Abb.4 u. Abb.5).

In der Toluidinblau-Färbung konnte man, sofern das Zentrum der Knospen nicht durch Gewebsnekrosen transparent war, meist zwei stark blau gefärbte, scharf abgrenzbare Knorpelstrukturen erkennen. Sie hatten oft ein länglich gebogenes, hantelförmiges Aussehen, d.h. zwei runde Strukturen, die durch eine dünne Brücke miteinander verbunden waren. Die Höcker entstanden, wenn die Knorpelstrukturen sich durch Größenzunahme der Oberfläche näherten. Die Samtkappen auf den Höckern, deren violette Färbung auf Schleimstrukturen aus Mukopolysacchariden hindeutete, traten nur an Stellen auf, an denen differenzierter Knorpel an die Oberfläche trat (Abb.6).

Die histologischen Präparate zeigten ebenfalls zentrale Nekrosen, umgeben von einer relativ konstant breiten Schicht

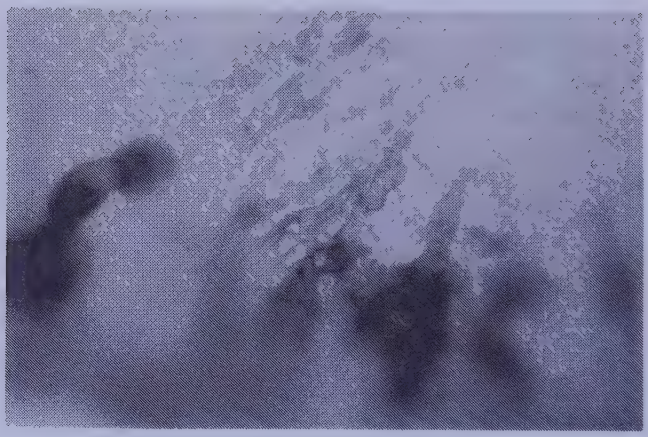


Abb. 5: Gleiche Extremitätenknospe wie Abb. 3. Detail der muskelbedeckten Oberfläche. (Vergr. 430x)

Abb. 6: Drei Tage lang kultivierte Extremitätenknospen. Toluidinblau-Färbung. Zwei paarige, längliche Knorpelstrukturen in jeder Knospe. (Vergr. 33x)

lebenden Gewebes, das mit einzelnen nekrotischen Zellen durchsetzt war. Den sonst recht glatten Randkonturen waren runde Muskelzellen aufgelagert, mit einem stark Cholinesterase-positiven Zytoplasma und einem oder mehreren hellen, großen Kernen mit deutlichem, dunklem Nukleolus. Darin unterschieden sie sich klar von den Zellen der chondrogenen Zone, die einen kleinen, stark gefärbten, länglichen Kern hatten. In der lebenden Randzone waren von der Zellanordnung und dem Extrazellulärraum her Knorpelregionen klar abzugrenzen.

Die fünf bzw. sechs Tage lang inkubierten Extremitätenknospen (Tab.1, Vers. 2b u. 3b) zeigten ein sehr unterschiedliches Erscheinungsbild. Die Größe schwankte zwischen 0,7 und 2 mm (lange Achse). Es war nicht mehr erkennbar, ob es sich um primäre Knospen oder um sekundäre Konglomerate handelte. Die Oberfläche war sehr unregelmäßig und höckrig. Die Oberflächenstruktur war glatt, auf den Höckern aber meist samtartig überzogen.

Die Samtkappen waren in der Toluidinblau-Färbung stark positiv, die restliche Oberfläche war nicht angefärbt. In den Höckern und um das Zentrum lagen scharf abgrenzbare, tiefblaue Knorpelregionen unterschiedlicher Form. Das Zentrum war meist nicht gefärbt.

Die auch in dieser Versuchsserie aufgetretenen zentralen Nekrosen, die ab einem bestimmten Abstand zur Oberfläche entstanden, zeigten, daß eine ausreichende Ernährung aller Zellen einer Extremitätenknospe nicht gewährleistet war. In dem Versuch, bei dem ganze Extremitätenknospen verwendet worden waren (Tab. 1, Vers. 1a) fiel ein Stagnieren der Entwicklung der noch lebenden Zellen auf, offensichtlich aufgrund der Mangelernährung. Diese Beobachtung legt den Schluß nahe, daß in der Zellregion, die am Ende der Diffusionsstrecke lag - also die zentrale Nekrose unmittelbar umgab - wahrscheinlich auch eine Entwicklungsverzögerung eingetreten war, die auf Mangelernährung zurückzufüh-

ren ist.

Um alle Zellen mit den zugesetzten Pharmaka zu erreichen und eine homogene Entwicklung zu gewährleisten, wurde in den nachfolgenden Versuchen anstatt der ganzen Extremitätenknospen eine Zellsuspension aus disaggregiertem Mesenchymgewebe verwendet. Dies führte zu einer Reaggregation der Zellen in der Art, wie sie von MOSCONA (1961) beschrieben wurde.

3.1.3. Rollerkulturen einer mesenchymalen Zellsuspension

Zur Anwendung kamen Zellen von Extremitätenknospen der Stadien 22/23, die ein, zwei oder drei Tage lang in der Rollerkultur inkubiert wurden (Tab. 1, Vers. 5 bis 9). Das sich in der Suspension befindende Zellmaterial bestand aus Einzelzellen und wenigen Konglomeraten aus zwei bis drei Zellen. Nach Abfüllen der Suspension in die Folientüten wurde der Rollvorgang unmittelbar begonnen, so daß die Zellen nicht sedimentieren konnten.

In den Kulturen, die einen Tag lang gerollt worden waren (Tab. 1, Vers. 5a), entstanden zahlreiche unregelmäßig geformte Zellaggregate in allen Größen bis 0,4 mm Durchmesser (Abb.7 u. Abb.8).

Histologisch zeigten die Aggregate eine homogene Mesenchymstruktur. Die Zellkerne hatten alle die gleiche Größe, helle Kernstruktur mit dunklem Nukleolus. Innerhalb des Mesenchyms waren keine Zonen besonderer Ausrichtung, Form oder Färbung der Zellen feststellbar. Die Zellabstände waren gleichmäßig groß. Es zeigten sich relativ viele Mitosefiguren. Weiterhin fiel auf, daß sich einige Zellen aus dem Zellverband an der Oberfläche gelöst und sich dieser locker aufgelagert hatten. Diese Zellen ließen sich aber noch nicht vom Aussehen her von den übrigen als Muskelzellen unterscheiden. In der Dimethylmethylenblau-Färbung

Abb. 7: Folienbeutel mit Mesenchymzellaggregaten nach einem Tag Kulturdauer. (Vergr. 4x)

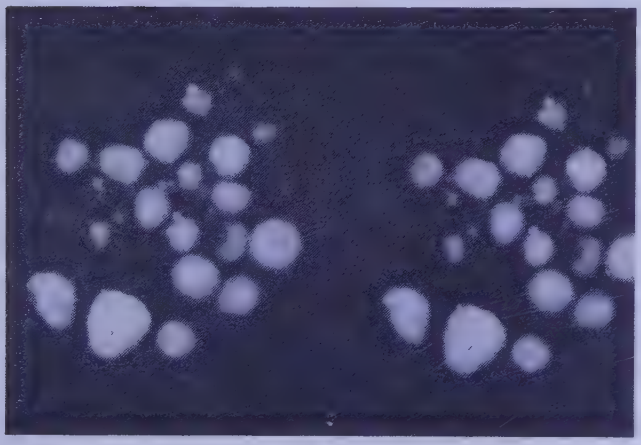


Abb. 8: Mesenchymzellaggregate nach einem Tag Kulturdauer. Stereoskopische Lebendaufnahme. (Vergr. 30x)

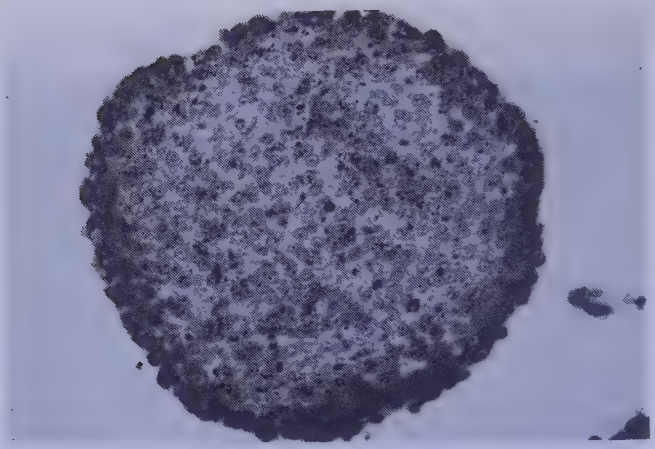
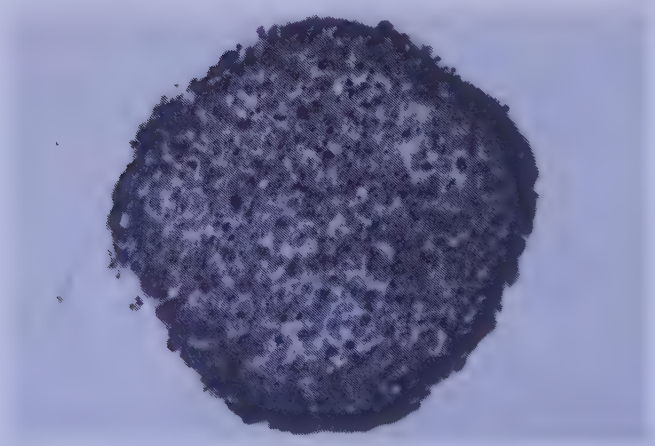


Abb.9 u. Abb.10: Mesenchymzellaggregate nach einem Tag Kulturdauer. Paraffinschnitt, Dimethylmethylenblau-Färbung. Noch keine Zelldifferenzierung erkennbar. (Vergr. 170x)
Abb. 9 (oben): Behandlung mit Atropin
Abb.10 (unten): Kontrollkultur



war metachromatisches Material noch nicht sichtbar (Abb.9 u. Abb.10).

Vor Beginn der Kultur waren zwei Beuteln zusätzlich zur Mesenchymzellsuspension die abgezogenen und disaggregierten Ektodermhüllen zugegeben worden. In den histologischen Schnitten sah man nun, daß sich die Ektodermzellen innerhalb des mesenchymalen Gewebes zu runden Formationen gruppiert hatten. In den meisten Fällen hatten sich diese Formationen bereits der Aggregatoberfläche aufgelagert. Dort zogen sie sich kappenförmig über das mesenchymale Gewebe und umgaben schließlich die Aggregate zu einem großen Teil. An den Rändern dieser Ektodermkappen konnte man eine deutliche Verdichtung des darunterliegenden Mesenchyms erkennen (Abb.11).

Wurden die Mesenchymzellkulturen zwei Tage lang inkubiert (Tab. 1, Vers. 6), entstanden zahlreiche, unregelmässig geformte Aggregate mit höckeriger Oberfläche. Die Grösse schwankte zwischen 0,2 mm und 0,8 mm (lange Achse). Die Oberflächenstruktur war glatt, auf den Höckern jedoch oft mit einem samtartigen Überzug versehen.

Die Cholinesterase-Färbung ergab eine homogene Färbung mit Maxima auf den Höckern. Auf fast allen Aggregaten konnte man stark Cholinesterase-positive, runde Muskelzellen erkennen, die in einzelnen Fällen eine längliche, spindelförmige Struktur hatten (Abb.12 u. Abb.13).

Bei Toluidinblau-gefärbten Aggregaten wurde deutlich, daß die Größenzunahme der Aggregate nicht nur auf ein einfaches Wachstum zurückzuführen war, sondern in erster Linie auf ein Aneinanderlagern der nach einem Tag beobachteten Primäraggregate zu größeren Konglomeraten. Die Knorpelzentren der Primäraggregate traten in den Höckern klar als Einzelstrukturen hervor. Es konnten nicht, wie bei den zwei Tage lang gerollten Extremitätenknospen beschrieben, ein oder zwei große, hantelförmige Knorpelzentren beobach-

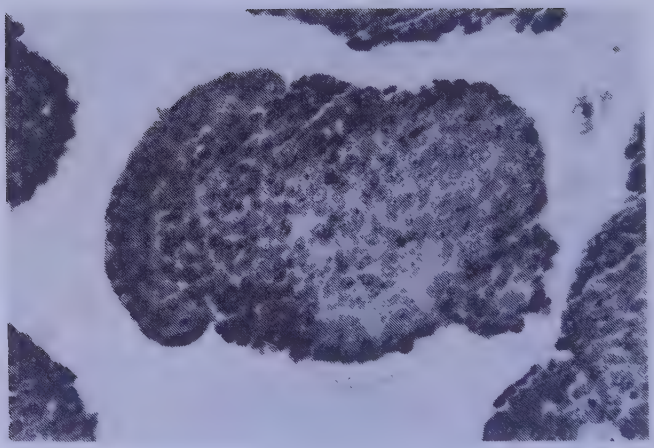


Abb. 11: Aggregat aus Mesenchymzellen und Ektodermzellen. Ein Tag Kulturdauer. Paraffinschnitt, Cholinesterase- und Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Aufgelagerte Ektodermkappe mit mesenchymaler Verdichtungszone an den Rändern. (Vergr. 170x)

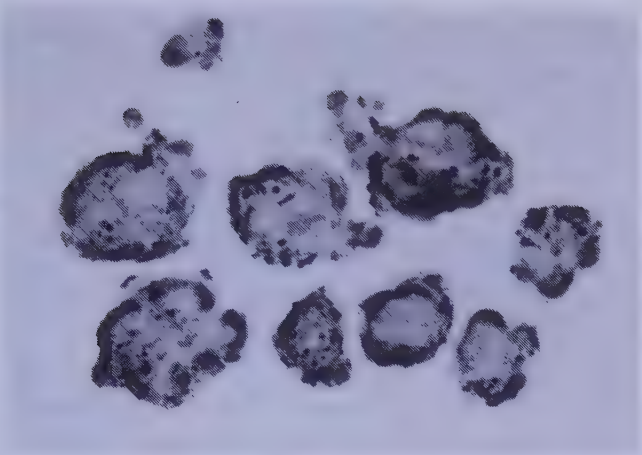


Abb. 12: Zwei Tage lang inkubierte Aggregate. Cholinesterase-Färbung. Stark Cholinesterase-positive Muskelzellen auf der Oberfläche. (Vergr. 55x)

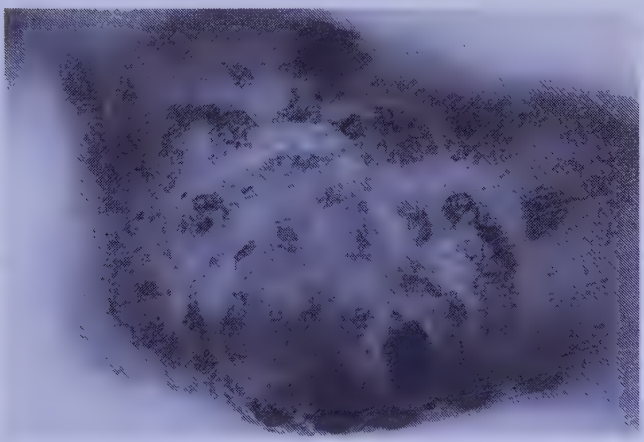


Abb. 13: Detail der Oberfläche von Abb. 11. Spindelförmige Muskelzellen. (Vergr. 330x)

tet werden, sondern nur mehrere kleine, voneinander getrennte Zentren runden Aussehens. Neben den größeren Konglomeraten konnte man auch noch einzelne Primäraggregate finden (Abb. 14 u. Abb. 15).

In den histologischen Präparaten sah man deutlich im Zentrum der Aggregate nebeneinander liegende Knorpelorganoide. Die Zellen der Knorpelorganoide hatten einen stark angefärbten, kleinen, länglichen Kern. In der Mitte der Organoide war im Toluidinblau-gefärbten Präparat Metachromasie und damit Knorpelgrundsubstanz erkennbar.

Die Cholinesterase-Färbung zeigte um das Zentrum der Aggregate herum eine konstant breite, ringförmige Cholinesterase-positive Zone. Deren Zellen hatten, im Gegensatz zu den zentralen Chondrozyten, einen größeren, helleren, ovalen Kern mit einem deutlich gefärbten Nukleolus, umgeben von Cholinesterase-positivem Zytoplasma. In dieser Zone kamen keine zirkulären Haufenstrukturen vor. Zur Oberfläche hin wurde die Cholinesterase-positive Schicht häufig von einer Cholinesterase-negativen Schicht mit Zellen gleichen Aussehens umgeben. In anderen Fällen zeigte jedoch nur die ganz oberflächliche Zellschicht Cholinesterase-Aktivität. Man konnte somit die Tendenz eines Wanderns der Cholinesterase-positiven Schicht von zentral nach peripher feststellen (Abb. 16).

Der Oberfläche aufgelagert waren Muskelzellen mit großem hellem, ovalem Kern und ebenfalls dunklem Nukleolus. Die Muskelzellen hatten eine runde Form mit zentralem Kern und stark Cholinesterase-positivem Zytoplasma. An manchen Aggregaten waren die Muskelzellen nur als Einzelstrukturen aufgelagert, an anderen verschmolzen sie zu einem kontinuierlichen Überzug. Zellgrenzen konnten nicht mehr erkannt werden. Oft war mehr als die Hälfte des Aggregates mit solch einem Mantel aus stark Cholinesterase-positiven Muskelzellen umgeben (Abb. 17).

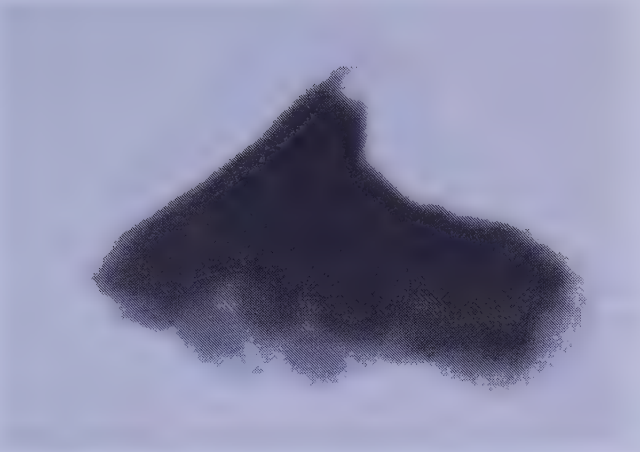


Abb. 14: Toluidinblau-gefärbtes Konglomerat aus mehreren Primäraggregaten mit Knorpelzentren. Zwei Tage Kulturdauer. (Vergr. 33x)

Abb. 15: Toluidinblau-gefärbte Primäraggregate mit metachromatischem Knorpelzentrum. (Vergr. 85x)

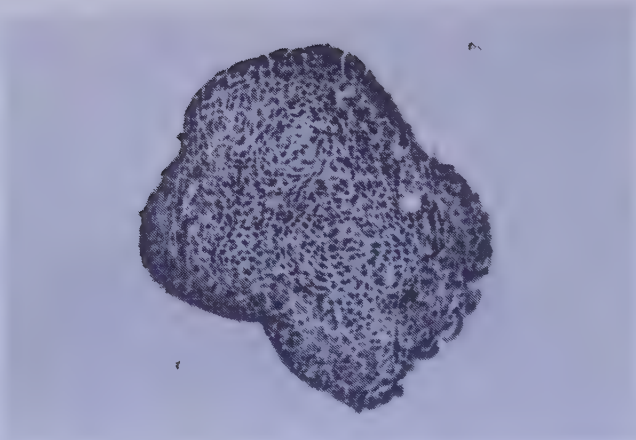


Abb. 16: Zwei Tage lang inkubiertes Aggregat. Keine Behandlung (Kontrollkultur). Paraffinschnitt, Cholinesterase- und Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Cholinesterase-positive Zone (heller als zentraler Knorpel) unter äußerer Muskelschicht. (Vergr. 110x)

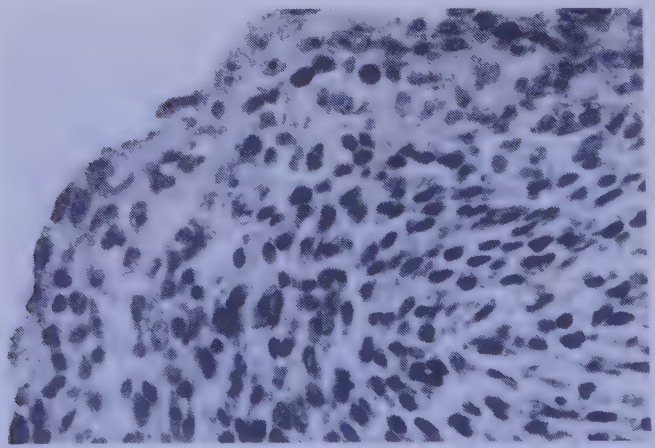


Abb. 17: Zwei Tage lang inkubiertes Aggregat. Paraffinschnitt, Cholinesterase- und Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Außen fusionierte Muskelzellen, darunter Cholinesterase-positive Zone, zentral zirkuläre Knorpelzone mit kleinen Kernen. (Vergr. 430x)

In zwei Versuchen wurde die Zellsuspension drei Tage lang inkubiert (Tab. 1, Vers. 7 u. 8). Hierbei zeigte sich, daß unterschiedliche Aggregatgrößen aus unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen resultierten. Während bei Versuch 7 mit einer Zellkonzentration von $1{,}25 \cdot 10^6$ Zellen/ml die Aggregatgröße zwischen 0,2 mm und 0,5 mm schwankte, erreichten die Aggregate in Versuch 8, in dem eine Zellkonzentration von $1{,}9 \cdot 10^6$ Zellen/ml verwendet wurde, Größen von 0,4 mm bis 1,2 mm (Durchmesser lange Achse). Beide Versuche zeigten jedoch gleiche Entwicklung. Es resultierten kugelförmige bis ovoide Aggregate mit unregelmäßiger, höckeriger Oberfläche.

Die Cholinesterase-Färbung schien bei den Totalpräparaten über das gesamte Aggregat homogen verteilt. Auf der Oberfläche waren, wie bei der 2-Tage-Kultur beschrieben, aufgelagerte Cholinesterase-positive Muskelzellen zu finden. Neben Muskelzellen mit einer mehr runden Form waren häufiger lange, spindelförmige Zellen mit mehreren Kernen zu erkennen. In einzelnen Fällen war auch eine parallele Ausrichtung der spindelförmigen Muskelzellen wahrzunehmen. Auf den Höckern war kein muskulärer Überzug mehr zu erkennen, ebenso bei kugelförmigen Aggregaten. Dies läßt den Schluß zu, daß die Muskelstrukturen, die exponierten Stellen aufgelagert sind,nach längerer Kulturdauer durch die beim Rollvorgang auftretenden Kräfte mechanisch abgeschilfert werden.

Histologisch bot sich ein ähnliches Bild wie bei der 2-Tage-Kultur. Im Zentrum der Aggregate traten jedoch wesentlich häufiger Nekrosen auf, umgeben von einer konstant breiten Schicht lebender Zellen. In den konzentrisch, zirkulär ausgerichteten Knorpelorganoiden trat Metachromasie und somit Knorpelgrundsubstanz auf. Cholinesterase-Aktivität fand sich nur noch in den aufgelagerten Muskelzellen und in einer schmalen Zone unter der Oberfläche (Abb. 18 u. Abb. 19).

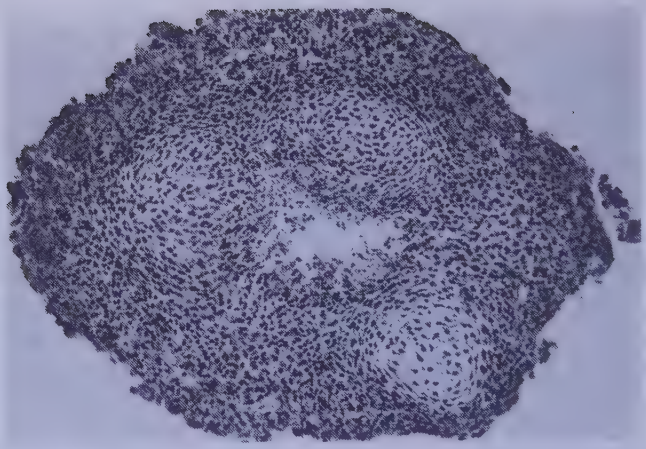


Abb. 18: Drei Tage lang inkubiertes Konglomerat aus drei Primäraggregaten. Drei deutliche Knorpelzentren mit Interzellularsubstanz. Das Zentrum des Konglomerates ist nekrotisch. Auf der Oberfläche ist eine kontinuierliche Muskelschicht vorhanden. ChE- und HE-Färbung, Paraffinschnitt. (Vergr. 110x)

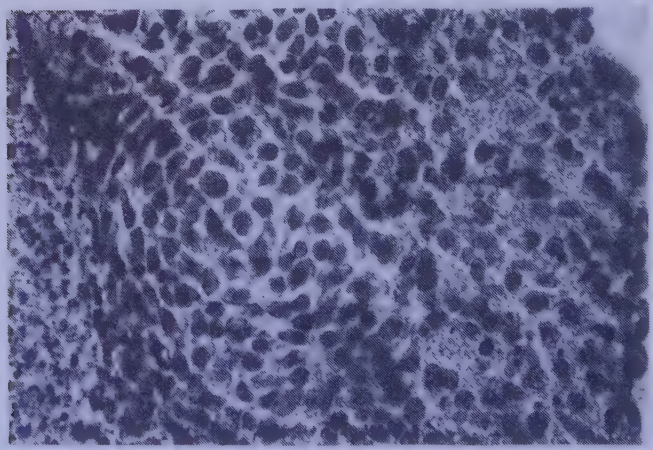


Abb. 19: Ausschnitt aus einem Konglomerat nach dreitägiger Inkubationszeit. Links nekrotisches Zentrum, in der Mitte primäres Knorpelorganoid, rechts Cholinesterase-positive Zone mit aufgelagerter Muskelschicht. ChE- u.HE-Färb.,Paraffinschn.(Vergr.110x)

Insgesamt erlaubte diese Art der Kultur eine relativ gute Beurteilung der Mesenchymdifferenzierung. Um jedoch die weitere Entwicklung der Primäraggregate verfolgen zu können, mußte eine Konglomeratbildung verhindert werden. Ebenso sollte das Abschilfern der Muskelzellen ausgeschlossen werden. Um dies zu erreichen, wurden die Primäraggregate nach eintägiger Rolldauer in ein einprozentiges Agar-Medium umgesetzt und dann unter CO_2-Begasung weiter inkubiert.

3.1.4. Rollerkulturen einer mesenchymalen Zellsuspension und anschließender Weiterinkubation in einprozentigem Agar-Medium

Um eine Beeinflussung der Entwicklung der Primäraggregate durch Bildung von Konglomeraten auszuschließen, wurden zwei Versuche (Tab. 1, Vers. 10 u. 11) durchgeführt mit einer Weiterinkubation in Agar-Medium von einem bzw. vier Tagen.

Kulturen, die im Anschluß an den Rollvorgang einen Tag in Agar-Medium wuchsen (Tab. 1, Vers. 10), schienen im Vergleich zur zweitägigen Rollerkultur (Tab. 1, Vers. 6) eine verzögerte Entwicklung zu haben. Die Aggregate hatten eine weitgehend runde Form. In dem Agar-Bereich um die Aggregate herum konnte man ein lockeres Netz ausgewanderter Fibrozyten unterschiedlicher Ausdehnung beobachten. Das Mesenchym zeigte ein homogenes Bild. Es waren noch keine Zonen präsumptiver Muskel- oder Knorpelzellen zu unterscheiden. Im Zentrum der Aggregate wurde wenig metachromatisches Material sichtbar. Der Aggregatoberfläche aufgelagerte Muskelzellen waren kaum zu erkennen. Insgesamt entsprach das Bild weitgehend dem der einen Tag lang gerollten Kultur (Tab.1, Vers. 5),(zu Vers. 10 siehe Abb. 20).

Bei Kulturen, die im Anschluß an den Rollvorgang vier Tage lang in Agar-Medium inkubiert worden waren (Tab. 1, Vers. 11), breitete sich ein dichter Fibrozytenlayer um die Aggregate aus. Die Aggregate waren unterschiedlich groß,

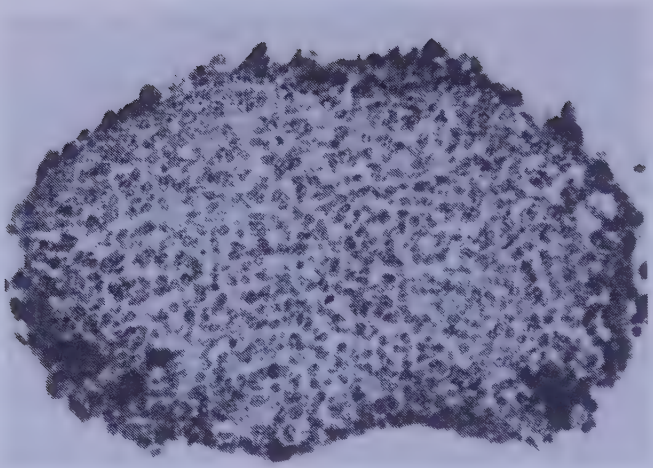


Abb. 20: Aggregat, das nach eintägiger Rollinkubation einen Tag lang auf Agar-Medium wuchs. Im Vergleich zu zweitägiger Rollerkultur (Abb.16 u. Abb.17) Entwicklungsverzögerung. Noch keine Mesenchymdifferenzierung. Paraffinschn.,HE-Färb. (Vergr. 170x)

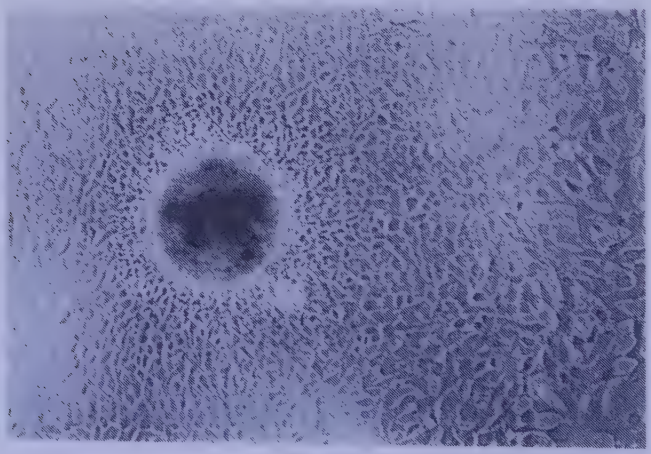


Abb.21: Aggregat, das nach eintägiger Rollinkubation vier Tage lang auf Agar-Medium wuchs. Keine oberflächliche Muskelschicht vorhanden. Präsumptive Muskelzellen sind möglicherweise auf dem Gefäßboden ausgewandert. Lebendaufnahme. (Vergr. 33)

hatten aber meist rundes Aussehen (Abb. 21).

Histologisch fanden sich deutliche, zirkulär konzentrische Knorpelhaufen. Die Kerne erschienen hell mit einem hervortretenden Nukleolus. In den Haufen waren die Interzellularräume wesentlich größer und zeigten deutlich Metachromasie (Abb. 22).

In beiden Versuchen wurden einigen Kulturen die disaggregierten Ektodermhüllen in die Zellsuspension zugegeben. Bei den Mesenchym-Ektoderm-Kulturen, die im Anschluß an den Rollvorgang einen Tag lang weiter inkubiert worden waren (Tab. 1, Vers. 10b), bot sich ein ähnliches Bild wie bei den Gemischkulturen, die nur einen Tag lang gerollt worden waren (Tab. 1, Vers. 5b). Die Ektodermzellen hatten sich entweder innerhalb des Mesenchymgewebes zu runden Strukturen zusammengeschlossen oder waren bereits zur Oberfläche hin ausgewandert und bildeten dort kappenartige Strukturen.

Die vier Tage lang in Agar-Medium inkubierten Aggregate fielen durch große, epithelausgekleidete Hohlräume auf. Diese lagen meist dicht unter der Oberfläche und gruppierten sich um die Knorpelhaufen. Auch die Oberfläche war zum Teil mit Epithelstrukturen besetzt (Abb. 23).

Ähnliche Hohlraumstrukturen fanden sich auch bei Versuchen, in denen ganze Hühnerembryonen disaggregiert und zwei Tage lang in Rollerkulturen inkubiert worden waren (Tab. 1, Vers. 12b). Die Hohlräume waren hier jedoch mit Zylinderepithel ausgekleidet und nicht wie bei den Agar-Kulturen mit Plattenepithel. Die epithelialen Hohlräume lagen in einem Gemisch der verschiedensten Zelltypen. Bei den nicht-epithelialen Zellen konnte noch kein Ordnen nach Gewebstypen beobachtet werden (Abb. 24).

Bei Kulturen aus ganzen Hühnchenembryonen, die nur einen Tag lang gerollt wurden (Tab. 1, Vers. 12a), konnte man bereits Vorstufen dieser Hohlraumbildungen erkennen, die sich als sternförmige Gruppen aus Zylinderepithelzellen darboten.

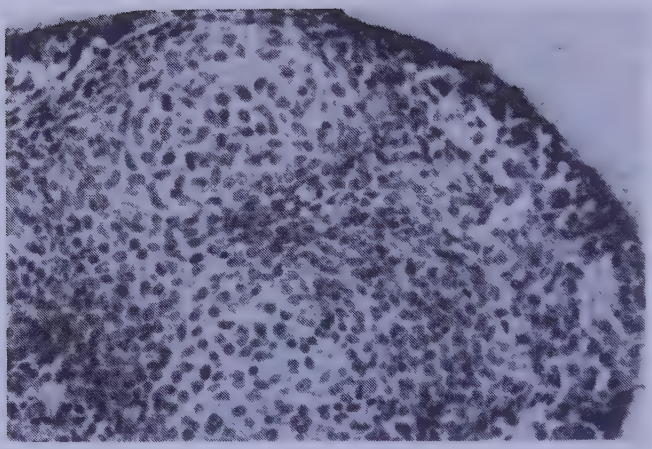


Abb. 22: Aggregat, das nach eintägiger Rollinkubation vier Tage lang auf Agar-Medium wuchs. Knorpelzentren vorhanden, jedoch keine Muskelzellen. Paraffinschnitt, HE-Färbung. (Vergr. 170x)

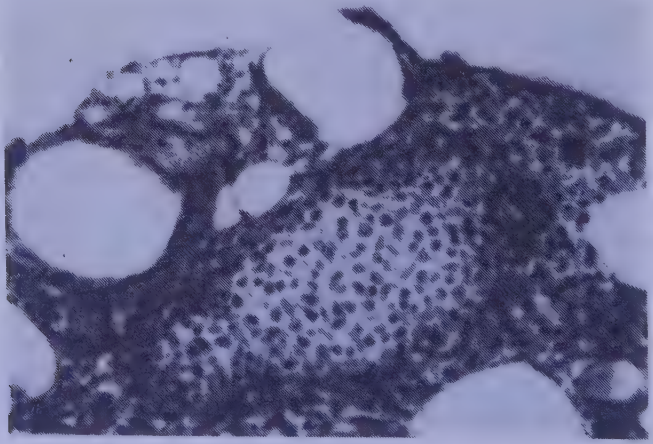


Abb. 23: Epithelausgekleidete Hohlräume bei Aggregat aus Mesenchym- und Ektodermzellen nach einem Tag Rolldauer und vier Tagen Agar-Medium. Paraffinschnitt, HE-Färbung. (Vergr. 170x)

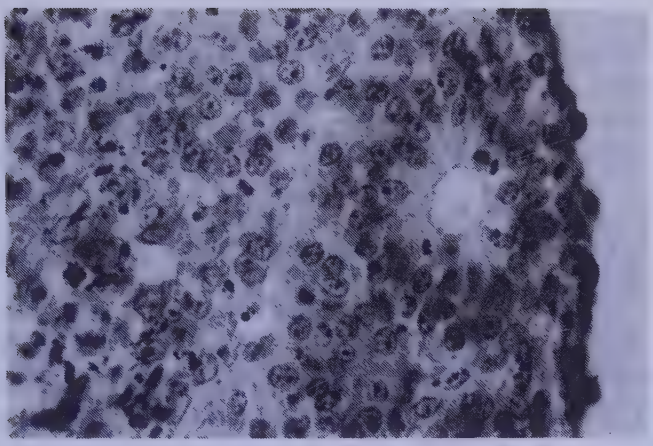


Abb. 24: Mit Zylinderepithel ausgekleideter Hohlraum bei Aggregat aus Zellen ganzer Embryonen nach zwei Tagen Rollinkubation. Paraffinschnitt, HE-Färbung. (Vergr. 430x)

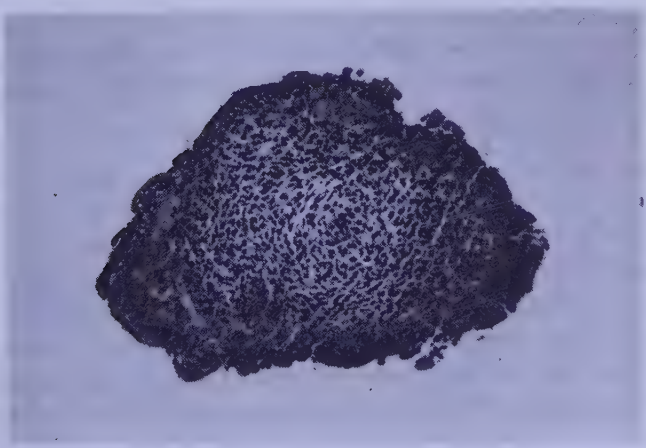


Abb. 25: Zwei Tage lang inkubiertes Aggregat. Carbachol-Behandlung. Vgl. Abb. 16. ChE- und HE-Färbung, Paraffinschnitt. (Vergr. 110x)

3.2. Pharmakologische Behandlung

In allen Versuchen wurden vor Beginn der Inkubation den Kulturen cholinerge Substanzen zugesetzt. Welche Pharmaka in den einzelnen Versuchen angewendet wurden, ist Tabelle 2 zu entnehmen. Die in der Kultur wirksamen Konzentrationen lagen eine Zehnerpotenz unter den Werten, für die HOFBAUER (Dissertation in Vorbereitung) Toxizität ermittelt hatte. Zelltötungen aufgrund allgemein toxischer Wirkung konnten daher ausgeschlossen werden.

Nach Abschluß der Kulturdauer konnte bei den Kulturen mit ganzen Extremitätenknospen von Größe und Aussehen her kein Unterschied zwischen Kontrollgruppe und behandelten Kulturen festgestellt werden. Auch die histologischen Schnitte ergaben sowohl in der Cholinesterase-Färbung, als auch in der Toluidinblau-Färbung keine Abweichungen zur Kontrolle. Unterschiedliches Aussehen der histologischen Präparate konnte nur im Hinblick auf die Größe der oben beschriebenen zentralen Nekrose beobachtet werden. Diese Schwankungen waren allerdings innerhalb gleich behandelter Gruppen genauso groß, wie im Vergleich zu Kontrollkulturen. Auch bei den länger gezüchteten Kulturen konnten keine Abweichungen beobachtet werden, die nur eine Behandlungsgruppe betroffen hätten.

Bei den Mesenchymzellaggregaten sah das Ergebnis ähnlich aus. Es waren hier zwar öfters Schwankungen im Aggregationsmuster der einzelnen Kulturen zu erkennen, d.h. viele kleinere oder wenige größere Aggregate. Doch zeigte sich auch hier keine Präferenz auf eine bestimmte Behandlungsgruppe. Sehr verschiedene Aggregationsmuster wurden häufig bei zwei völlig gleich behandelten Kulturen desselben Versuchs beobachtet. Die Größenunterschiede waren in der Regel auf eine unterschiedliche sekundäre Konglomeratbildung und nicht auf Wachstumsunterschiede der Primäraggregate zurückzuführen (vgl. Abb. 9 mit Abb.10 u. Abb.16 mit Abb.25).

Tabelle 2

Anzahl der mit cholinerger Substanz behandelten Kulturen pro Versuch

Versuch		1a	1b	2a	2b	3a	3b	4	5a	5b	6	7	8	9	10a	10b	11a	11b
Pharmakon	mol/l																	
Atropin	10^{-4}	1	1	1	1	1	1	2	7	1	2	1	2	2	9	1	9	1
Pilocarpin	10^{-4}	1	1	1	1	1	1	2			2	1	2	2				
Carbachol	10^{-3}	1	1	1	1	1	1	2			2		2	2				
Eserinsulfat	10^{-4}	1	1															
Eserinsulfat + Acetylcholin	10^{-4} 10^{-3}	1	1	1	1	1	1	2							9		9	
Chlorpromazin	10^{-4}			1	1	1	1	2			2	1	2	2				
Tremorin	10^{-4}										2		2	2				

In den histologischen Präparaten konnten insbesondere im Hinblick auf die Knorpelorganoidbildung und das Auftreten von Muskelzellen keine auffallenden Unregelmäßigkeiten im Vergleich zu Kontrollgruppen beobachtet werden. Bei längerer Kulturdauer variierte das Aussehen der einzelnen, inzwischen sekundär verklumpten Aggregate verständlicherweise stark. Doch auch diese Beobachtungen standen nicht in Abhängigkeit von einer bestimmten Behandlung. Die Cholinesterase-Färbung und die Färbung mit Toluidinblau waren in allen Kulturen eines Versuches sehr homogen. Lediglich die Kulturen, denen Eserinsulfat zugesetzt worden waren, zeigten in der Cholinesterase-Färbung eine wesentlich schwächere Anfärbung als alle anderen Kulturen. Wie sich bei der histologischen Beurteilung ergab, hatte dieser Unterschied in der Färbung seine Ursache jedoch nicht in einer verminderten Organoidbildung oder einer allgemeinen Hemmung der Entwicklungsbewegungen, sondern war durch die Cholinesterase-hemmende Wirkung des Eserins erklärbar. Da die im Kultursystem vorhandene Cholinesterase durch das Eserin blockiert worden war, ließ sie sich nicht mehr mit der Färbung darstellen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß in keinem der durchgeführten Versuche signifikante Unterschiede einer Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe oder einer anderen Behandlungsgruppe auftraten.

4. Diskussion

Die Zielsetzung der für diese Arbeit durchgeführten Experimente war, durch Behandlung mit cholinergen Substanzen die Differenzierung mesenchymaler Zellen aus der Extremitätenknospe des Hühnchens *in vitro* zu beeinflussen.

Die *in*-*vitro*-Kultur bietet gegenüber *in*-*vivo*-Experimenten verschiedene Vorteile. Sie gewährleistet eine direkte Beobachtung der Entwicklungsvorgänge. Zugesetzte Pharmaka sind überall in gleicher Konzentration vorhanden. Die komplexen Mechanismen der Pharmakokinetik werden ausgeschaltet, eine Entgiftung durch den Organismus wird verhindert. Die Kulturbedingungen sind außerdem standardisierbar. Nachteilig ist die schlechtere Darstellung tatsächlich ablaufender Entwicklungsvorgänge.

Ich orientierte mich bei meinen Experimenten an den Ergebnissen von HOFBAUER (Dissertation in Vorbereitung), der eine Beeinflussung mit cholinergen Substanzen in einer Versuchsserie mit Monolayer-Kulturen untersuchte. HOFBAUER konnte für eine Reihe von Substanzen zytotoxische Grenzkonzentrationen ermitteln, jedoch bei Zugabe subtoxischer Konzentrationen keine signifikante Änderung der Differenzierung mesenchymaler Zellen beobachten.

Die Monolayer-Kultur aus Mesenchymzellen schließt eine Beeinflussung durch andere Gewebe aus und bietet ein gut zugängliches, reproduzierbares und standardisierbares System. Die Zellen werden allerdings auf dem Boden des Kulturschälchens zu einer amöboiden Beweglichkeit angeregt, die *in vivo* nicht vorhanden ist (DREWS u. DREWS, 1973). Daraus resultiert eine Zellanordnung in einer flachen Schicht, die den tatsächlichen Verhältnissen nicht entspricht.

4.1. Entwicklungsverlauf ganzer Extremitätenknospen in der Rollerkultur

Um zu klären, ob ein Einfluß auf die Differenzierung der Mesenchymzellen mit cholinergen Substanzen dann möglich ist, wenn die Zellen in ihrem natürlichen Verband belassen werden, führte ich Versuche mit ganzen Extremitätenknospen in der Rollerkultur durch. Dies brachte eine grössere Annäherung an die in-vivo-Verhältnisse. Durch den Rollvorgang wurde verhindert, daß die Extremitätenknospen festwuchsen und die Zellen auswanderten.

4.1.1. Extremitätenknospen mit Ektodermhülle

Bei Kulturen, in denen den Extremitätenknospen die Ektodermhülle belassen worden war, stagnierte die Entwicklung, nachdem sich die ektodermalen Wundränder über der Schnittfläche geschlossen hatten. Es bildete sich so eine die Knospe umschließende Ektodermblase. Anschließend wurde das Mesenchymgewebe nekrotisch. Offenbar war die Diffusion von Nährstoffen nach Verschließen der Ektodermhülle nicht mehr in ausreichendem Maße gewährleistet.

4.1.2. Extremitätenknospen ohne Ektodermhülle

Entfernt man nach kurzzeitiger Trypsin-Pankreatin-Behandlung die Ektodermhülle von den Extremitätenknospen, so ist die Ernährung durch Diffusion zu Beginn der Kultur noch ausreichend. Ab einer Knospengröße von 0,8 mm bis 1 mm Durchmesser entstand jedoch im Zentrum der Knospe eine Nekrose, offenbar bedingt durch die längere Diffusionsstrekke. Bei Extremitätenknospen, bei denen noch keine zentrale Nekrose aufgetreten war, zeigte sich eine Entwicklung, die der Entwicklung in vivo sehr nahe kam. Bei drei Tage lang inkubierten Kulturen erkannte man deutlich eine Zeugopod-

Entwicklung, d.h. die paarige Anordnung zweier länglicher Knorpelstrukturen, die Ulna und Radius bzw. Tibia und Fibula entsprachen. Eine einzelne Knorpelstruktur, die Humerus bzw. Femur entsprochen hätte, war nicht zu erkennen. Dies läßt sich durch die distale Schnittführung beim Abschneiden der Extremitätenknospen erklären.

Auf der Oberfläche der drei Tage lang inkubierten Extremitätenknospen konnten Muskelzellen beobachtet werden, die zum Teil bereits parallel ausgerichtet waren. Nach einer Kulturdauer von zwei Tagen war noch keine Knorpelgrundsubstanz und noch keine Muskelentwicklung zu erkennen. Wie aus Tabelle 3 zu entnehmen ist, trat ein der Drei-Tage-Kultur entspechendes Entwicklungsbild bei Hühnerembryonen des Stadiums 27 auf, also bei etwa fünf Tage alten Embryonen. Die Entwicklung der Kultur war zu diesem Zeitpunkt also um ein bis eineinhalb Tage verzögert.

4.1.3. Behandlung mit cholinergen Substanzen

Die Behandlung mit cholinergen Substanzen führte hier allerdings nicht zu einer sichtbaren Änderung der Differenzierungsvorgänge. Als mögliche Ursache hierfür, zog ich in Betracht, das die Substanzen nicht oder nicht in ausreichender Konzentration zu den sich differenzierenden Zellen vordringen konnten.

Tabelle 3 Entwicklungsstufen der Extremitätenknospe des Hühnchens *in vivo*

Stadium	Knorpelentwicklung nach SEARLS, HILFER u. MIROW (1972)	Muskelentwicklung nach HILFER, SEARLS u. FONTE (1973)	Cholinesterase-Aktivität nach DREWS u. DREWS (1972)
18 65-69h	Zellen gleicher Form und Größe. Keine Regionen mit erkennbarer Differenzierung	Zellen des frühen Flügelmesenchyms haben alle das gleiche Erscheinungsbild. Fibrilläre und granuläre Strukturen zwischen den Zellen.	Kompakter ChE-negativer mesodermaler Kern, positiver Ektodermüberzug, sichelförmige, stark reagierende Randleiste.
19 68-72h			
20 70-72h			Auftreten von ChE-Aktivität im mesodermalen Kern. Verstärkung der Aktivität in der Randleiste. Auflockerung und Vaskularisierung des Mesoderms, begleitet von Aktivitätszunahme.
21 ca. 3,5d			
22 ca. 3,5d			Ektoderm verliert Aktivität mit Ausnahme der Randleiste. Mesenchymaler Kern weiterhin ChE-aktiv.
23 3,5-4d	Die Chondroblasten sind vom Weichteilmantel abgrenzbar. Chondroblasten sind kleiner und haben weniger Zytoplasma. Die Zellmembran ist mit einer nahezu kontinuierlichen Schicht amorphen Materials besetzt. Noch keine Metachromasie.	Kompakte Haufen basophiler Zellen dorsal und ventral der knorpelformenden Region	
24 ca. 4d			Aktivitätszunahme des mesenchymalen Kerns. Zwischen Kern und positiver Randleiste negative Zellschicht. Knorpelkondensationen mit Anstieg der ChE-Aktivität.

Tabelle 3 Fortsetzung

Stadium	Knorpelentwicklung	Muskelentwicklung	Cholinesterase-Aktivität
25 ca.4,5d	Knorpelformende und muskelformende Regionen klar voneinander abgrenzbar. Zellen der knorpelformenden Region zeigen kaum Unterschied zu Zellen des St.23, außer ersten Spuren metachromatischen Materials. Ausgeprägte Zunahme der Extrazellularsubstanz. Größte Mengen extrazellularen Materials an Stellen großer Zelldichte.	Dorsal und ventral nahezu kompakte und kontinuierliche Masse von Zellen, über die gesamte Zone ausgedehnt. Wenige Zellen sind verlängert, sind jedoch nicht in eine bevorzugte Richtung ausgerichtet. Noch keine Zellfusionen.	Spitze der Flügelanlage zeigt präaxial stark positives Mesoderm, postaxial negatives Mesoderm. Anlage für Humerus scharf abgegrenzt, proximal und distal aktives Mesenchym. Mittlerer Abschnitt negativ. Auftreten einzelner ungeordneter, stark aktiver Myoblasten.
26 4,5-5d		Beginn der Zellfusionen. Anzahl steigt ständig an. Es sind jedoch kaum längere Muskelschläuche vorhanden. Kerne der fusionierten Zellen sind relativ weit voneinander getrennt.	
27 ca.5d	Zellen der knorpelformenden Region richten sich zum Teil senkrecht zur langen Achse des Flügels aus. Größerer Grad an Organisation. Große Mengen amorphen Materials werden noch nicht beobachtet. Zellen sehen kleiner aus als in vorhergehenden Stadien.	Querstreifung wird sichtbar. Kerne der fusionierten Zellen liegen dichter beieinander. Zellfusionen und Myofilamentbildung treten überall in der muskelformenden Region auf.	In den Skelettelementen zentral ChE-Aktivitätsabnahme. Umgebendes vaskularisiertes Mesenchym stark aktiv. Aus einkernigen Myoblasten entwikkeln sich ungeordnete Netze mehrkerniger Muskelschläuche. ChE-aktive Knorpelkondensation entsteht direkt aus positivem Mesenchym. Die präsumptiven Myoblasten durchlaufen eine ChE-negative Phase.

4.2. Entwicklungsverlauf einer mesenchymalen Zellsuspension in der Rollerkultur

Um zu gewährleisten, daß die Pharmaka mit Sicherheit die Zellen erreichen, führte ich eine Versuchsserie mit Reaggregationskulturen aus einer Einzelzellsuspension durch, die weitgehend dem von MOSCONA (1961) beschriebenen Verfahren entsprachen. Hierbei ist während der ersten Stunden bis zur Bildung der ersten kleinen Primäraggregate die völlige Umspülung der Einzelzelle mit Medium und cholinerger Substanz gewährleistet.

4.2.1. Allgemeiner Kulturverlauf

Da sich das von mir angewandte Rollverfahren von der Technik von MOSCONA (1961) unterschied, untersuchte ich den allgemeinen Kulturverlauf dieser Vertikal-Rollerkulturen ausführlicher.

Nach einem Tag Kulturdauer entstanden zahlreiche Primäraggregate bis etwa 0,4 mm Durchmesser. Diese Primäraggregate zeigten noch keine Knorpelzone. Der Oberfläche waren wohl Zellen aufgelagert, die sich zu Muskelzellen differenzieren sollten, aber zu diesem Zeitpunkt noch Cholinesterase-negativ waren. Dieser Entwicklungsstand kam etwa Stadium 24 (Tabelle 3) gleich. Das entsprach einer Zeitdifferenz von etwa 12 Stunden.

In Kulturen, in denen der Mesenchymzellsuspension Ektodermzellen zugegeben worden war, hatten sich den resultierenden Aggregaten kappenartige Epithelstrukturen aufgelagert, die in manchen Fällen die Aggregate zum Teil umgaben. Die an den Rändern der Epithelstrukturen auftretenden mesenchymalen Verdichtungen könnten als ektodermale Induktionsvorgänge gedeutet werden (ZWILLING, 1968; GUMPEL-PINOT, 1980). Auf dieses Phänomen soll hier jedoch nicht

näher eingegangen werden.

Wenn man die Mesenchymzellsuspension zwei Tage lang züchtete, konnte man erkennen, daß sich die beschriebenen Primäraggregate zu größeren Konglomeraten zusammengelagert hatten. Im Zentrum jedes Primäraggregates konnte man die Bildung eines runden Knorpelorganoids beobachten. In der Mitte der Organoide zeigte sich Metachromasie. Eine Differenzierung zu Muskelzellen, die der Oberfläche aufgelagert waren, war zu diesem Zeitpunkt auch bereits nachweisbar. Parallele Ausrichtung mehrkerniger Muskelzellen war erst an wenigen Aggregaten zu erkennen. Vergleicht man dieses Bild mit der Entwicklung in vivo (Tab. 3), so findet man entsprechende Verhältnisse im Stadium 26, also bei etwa 4 1/2 bis 5 Tage alten Embryonen. Da für die Kulturen Embryonen des Stadiums 22/23 (3 1/2 Tage alt) verwendet wurden, folgt daraus eine Verzögerung der Entwicklung von etwa 12 bis 24 Stunden. Nach drei Tagen Kulturdauer zeigten die aus mehreren Primäraggregaten zusammengesetzten Konglomerate in den zentralen Bereichen Nekroseerscheinungen. Die Knorpelorganoide der peripher liegenden Primäraggregate waren ringförmig um das Zentrum herum angeordnet. Das zwischen den einzelnen Knorpelorganoiden liegende Mesenchymgewebe verschwand, so daß ein um die zentrale Nekrose herum gelagerter Ring von Knorpelgewebe entstand. In dem diesen Knorpelring umgebenden Mesenchymgewebe konnte man deutlich eine Cholinesterase-positive Zellschicht erkennen, die auf weitere Differenzierungsvorgänge der Mesenchymzellen hinweist. Auf der Oberfläche der Sekundäraggregate waren parallel ausgerichtete, mehrkernige Muskelzellen zu erkennen. Beim Vergleich mit der in-vivo-Entwicklung (Tab. 3) fiel auf, daß dieser Entwicklungsstand Stadium 27 und später entsprach, so daß neben der bereits bei der Zwei-Tage-Kultur beschriebenen Verzögerung von 12 bis 24 Stunden keine weitere Verlangsamung der Entwicklung zu bemerken war. Die Verzögerung der Entwicklung dieser Kulturen war wesentlich geringer als die der ganzen Extremitä-

tenknospen, die sicher auf einen Mangel an Nährstoffen zurückzuführen war.

Als Gründe für die hier konstant bleibende Zeitdifferenz können die während der Herstellung der Zellsuspension auftretenden zellschädigenden Einflüsse angenommen werden. So entstehen bei der Lockerung des Zellverbandes mit Trypsin-Pankreatin-Lösung Membranschädigungen. Auch wird das interzelluläre Milieu während der Disaggregation der Gewebe zerstört. Ebenso treten Schwankungen des pH-Wertes sowie Nährstoffmangel während der Zentrifugation auf. Nach Beginn der Kultur müssen die Zellen, bevor eine Reaggregation möglich ist, Membranschäden beheben und das interzelluläre Milieu wieder aufbauen (MOSCONA u. MOSCONA, 1966). Die hier beobachtete Verzögerung von 12 bis 24 Stunden deckt sich gut mit der Zeitdifferenz von 10 bis 20 Stunden, die bei den Experimenten von MEDOFF (1967) auftraten.

Die Differenzierung zu Muskelzellen wurde jedoch weder von MEDOFF (1967), noch von ZWILLING (1966) beobachtet, die beide Mesenchymkulturen nach der Methode von MOSCONA (1961) untersuchten. Bei beiden trat lediglich eine Differenzierung zu Knorpel auf. Dies könnte seine Ursache darin haben, daß bei den dort verwendeten Schwenkkulturen durch die rotierende Bewegung der Mesenchymzellsuspension wesentlich stärkere Scherkräfte auftraten als in den hier verwendeten Vertikal-Rollerkulturen. Da die Muskelzellen der Aggregatoberfläche anfangs sehr locker aufgelagert sind, könnten sie durch die auftretenden Kräfte abgeschilfert worden sein. Für diese Annahme würde auch das Fehlen von Muskelzellen auf exponierten Stellen der Aggregate bei längerer Kulturdauer auch bei der hier beschriebenen Kulturtechnik sprechen.

4.2.2. Behandlung mit cholinergen Substanzen

In allen hier aufgeführten Versuchen wurden neben Kontrollproben den einzelnen Kulturen verschiedene cholinerge Substanzen zugesetzt (siehe Tab. 2). In keinem dieser Versuche konnte ein signifikanter Unterschied in der Mesenchymdifferenzierung oder der Entwicklung von Organstrukturen im Vergleich zu Kontrollkulturen festgestellt werden. Folgende Erklärungsmöglichkeiten für das Fehlen einer Wirkung können ausgeschlossen werden:

1. Der zu beeinflussende Rezeptor kann durch die Substanzen nicht erreicht werden.

Da Substanzen mit sehr unterschiedlichen Löslichkeiten verwendet wurden (GUSTAFSON u. TONEBY, 1970), ist diese Annahme unwahrscheinlich. Es wurden auch sehr lipophile und damit membrangängige Substanzen, wie z.B. Tremorin oder Chlorpromazin, verwendet.

2. Die Konzentration der zugesetzten Substanzen war zu niedrig.

Dies konnte durch Verwendung von Pharmakonkonzentrationen, die knapp unterhalb der von HOFBAUER (Dissertation in Vorbereitung) für Monolayer-Kulturen ermittelten toxischen Konzentrationen lagen, ausgeschlossen werden.

3. Das Enzymsystem ist durch die Aufbereitung der Zellen für die Kultur so geschädigt, daß über dieses System die Differenzierungsfähigkeit nicht mehr beeinflußt werden kann.

Dem ist entgegenzuhalten, daß die Kontrollkulturen einen dem Lebenden entsprechenden Entwicklungsverlauf zeigten, wenn auch mit einer initialen zeitlichen Verzögerung. Folglich muß das Enzymsystem intakt gewesen sein, sofern es für die normale Mesenchymdifferenzierung eine wichtige Rolle spielt.

Nachdem das vorübergehende Auftreten eines cholinergen Enzymsystems während der Differenzierung des embryonalen Mesenchymgewebes durch DREWS u. DREWS (1972,1973), FLUCK (1978), SCHRÖDER (1980) und SCHMIDT (1981) nachgewiesen worden ist, war es das Ziel dieser Arbeit, durch Beeinflussung des Enzymsystems mit cholinergen Substanzen eine Veränderung der Mesenchymdifferenzierung oder der Form der resultierenden Organstrukturen zu bewirken. Durch Verwendung der Rollerkulturtechnik konnte überprüft werden, ob durch eine andere Kulturmethode, als der von HOFBAUER (in Vorb.) verwendeten Monolayer-Kulturen, eine Beeinflussung des cholinergen Enzymsystems und damit eine Änderung im Differenzierungsverhalten der Mesenchymzellen möglich ist.

Da bei beiden Methoden (ganze Extremitätenknospen und Reaggregationsmethode) keine signifikanten Unterschiede in der Mesenchymdifferenzierung auftraten, müssen als Ursachen für das Fehlen eines Effektes die folgenden Möglichkeiten bedacht werden:

1. Eine wirksame Beeinflussung des Zellstoffwechsels ist nur durch rhythmische Zugabe der Substanzen möglich, wie die z.B. bei der Transmitterübertragung im Nervensystem geschieht. Bei meinen Versuchen blieb die Pharmakonkonzentration konstant.

2. Es findet zwar eine Beeinflussung des Enzymsystems statt, die dadurch hervorgerufenen Veränderungen der Kulturentwicklung sind jedoch so gering, daß sie sich den hier verwendeten Beobachtungsmethoden entzogen.

3. Das cholinerge Enzymsystem beeinflußt die Formgebung der Skelettelemente und die Ausbildung der sich entwickelnden Knorpel- und Muskelindividuen, wie dies LANDAUER (1977) und McBRIDE (1980) beschrieben haben. Da in den von mir angewandten Methoden eine weitergehende Organentwicklung nicht möglich war, waren entsprechende Veränderungen nicht zu erkennen.

5. Zusammenfassung

In der Extremitätenentwicklung des Hühnchens tritt ein cholinerges System auf, das durch Acetylcholinesterase, Cholin-Acetyltransferase und einen muscarinischen Rezeptor für Acetylcholin charakterisiert wurde (SCHMIDT, 1981).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, dieses System durch cholinerge Substanzen in vitro zu beeinflussen.

Es wurde ein Rollerkultursystem verwendet, in dem

1. ganze Extremitätenknospen
2. eine Zellsuspension aus dem Mesenchym der Knospen

gezüchtet wurden.

Die Extremitätenknospen zeigten eine Differenzierung zu paarigen Knorpelstrukturen und oberflächlichen, parallelen Muskelsträngen. Eine Beeinflussung der Entwicklung mit cholinergen Substanzen war nicht möglich.

Die Kultur der mesenchymalen Zellsuspension ergab zahlreiche Zellaggregate, die nach zwei Tagen Kulturdauer eine Differenzierung zu Knorpel- und Muskelzellen erkennen ließen. Die Zellaggregate zeigten zentral ein aus zirkulär angeordneten Zellen bestehendes Knorpelorganoid mit Knorpelgrundsubstanz. Der Oberfläche aufgelagert waren zahlreiche Muskelzellen und fusionierende Myoblasten, die sich zu parallelen Strängen ausrichteten. Zwischen beiden Geweben war eine Zone undifferenzierter Mesenchymzellen erkennbar, die Cholinesterase-Aktivität zeigte.

Die Primäraggregate vereinigten sich nach etwa drei Tagen Kulturdauer zu größeren Konglomeraten, deren Zentrum wegen der größeren Diffusionsstrecke nekrotisch wurde.

Durch Zugabe von cholinergen Substanzen konnte auch in

diesem System keine Änderung des Differenzierungsverhaltens der Mesenchymzellen erzielt werden.

Die Differenzierung in der Rollerkultur wird mit der Entwicklung einer Monolayer-Kultur und der Differenzierung *in vivo* verglichen.

6. Literaturverzeichnis

DREWS, U.: Cholinesterase in embryonic development. Prog. Histochem. Cytochem. 7/3 (1975)

DREWS, U., DREWS, U.: Cholinesterase in der Extremitätenentwicklung des Hühnchens: I. Phasen der Cholinesterase-Aktivität in der jungen Knospe und bei Abgrenzung von Knorpel- und Muskelanlagen. Wilhelm Roux' Arch. Entwicklungsmechan. Org. 169, 70-86 (1972)

DREWS, U., DREWS, U.: Cholinesterase in der Extremitätenentwicklung des Hühnchens: II. Fermentaktivität und Bewegungsverhalten der präsumptiven Knorpelzellen in vitro. Wilhelm Roux' Arch. Entwicklungsmechan. Org. 173, 208-227 (1973)

DREWS, U., KUSSÄTHER, E., USADEL, K. H.: Histochemischer Nachweis der Cholinesterase in der Frühentwicklung der Hühnerkeimscheibe. Histochemie 8, 65-89 (1967)

FLUCK, R. A.: Acetylcholine and acetylcholinesterase activity in early embryos of the medaka oryzias latipes, a teleost. Dev. Growth Differ. 20, 17-25 (1978)

FLUCK, R. A., WYNSHAW-BORIS, A. J., SCHNEIDER, L. M.: Cholinergic molecules modify the in vitro behavior of cells from early embryos of the medaka oryzias latipes, a teleost fish. Comp. Biochem. Physiol. 67, 29-34 (1980)

GUMPEL-PINOT, M.: Limb chondrogenesis: Interactions between ectoderm and mesoderm. Teratology of the limbs. (H.-J. Merker, H. Nau, D. Neubert, Eds.) Berlin, Walter de Gruyter, 43-51 (1980)

GUSTAFSON, T., TONEBY, M.: On the role of serotonin and acetylcholine in sea urchin morphogenesis. Exp. Cell Res. 62, 102-117 (1970)

HAMBURGER, V., HAMILTON, H. L.: A series of normal stages in the development of chick embryo. J. Morphol. 88, 49-92 (1951)

HILFER, S. R., SEARLS, R. L., FONTE, V. G.: An ultrastructural study of early myogenesis in the chick wing bud. Develop. Biol. 30, 374-391 (1973)

HOFBAUER, D.: Die Wirkung cholinerger Substanzen auf das Mesenchym der Hühnchenextremitätenknospe in vitro. (Dissertation in Vorbereitung)

KARNOVSKY, M. J., ROOTS, L.: A "direct coloring" thiocholine method for cholinesterases. J. Histochem. Cytochem. 12, 219-221 (1964)

LANDAUER, W.: Cholinomimetic teratogens. Teratology 15, 33-42 (1977)

McBRIDE, W. G.: The effects of anticholinergic drugs on the development of the chick embryo. IRCS Medical Science 8, 537 (1980)

MEDOFF, J.: Enzymatic events during cartilage differentiation in the chick embryonic limb bud. Develop. Biol. 16, 118-143 (1967)

MINGATI, A., FALUGI, C.: An epithelial localization of the acetylcholinesterase in the ascidian ciona intestinalis embryos and larves. Acta Embryol. Morphol. Exper. n. s. 1, 143-155 (1980)

MOSCONA, A. A.: Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells. Exp. Cell Res. 22, 455-475 (1961)

MOSCONA, M. H., MOSCONA, A. A.: Inhibition of cell aggregation in vitro by Puromycin. Exp. Cell Res. 41, 703-706 (1966)

OZAKI, H.: Localization and multiple forms of acetylcholinesterase in sea urchin embryos. Dev. Growth Differ. 16, 267-279 (1974)

OZAKI, H.: Molecular properties and differentiation of acetylcholinesterase in sea urchin embryos. Dev. Growth Differ. 18, 245-257 (1976)

ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik. R. Oldenbourg, München-Wien (1968)

SCHMIDT, H.: Muscarinic acetylcholine receptor in chick limb bud during morphogenesis. Histochem. 71, 89-98 (1981)

SCHRÖDER, C.: Characterization of embryonic cholinesterase in chick limb bud by colorimetry and disk electrophoresis. Histochem. 69, 243-253 (1980)

SEARLS, R. L., HILFER, S. R., MIROW, S. M.: An ultrastructural study of early chondrogenesis in the chick wing bud. Develop. Biol. 28, 123-137 (1972)

TOEPFER, K.: Spektralphotometrische und histochemische Eigenschaften von 1:9 Dimethyl-Methylenblau als metachromatischem Farbstoff. Histochemie 21, 64-72 (1970)

ZWILLING, E.: Cartilage formation from so-called myogenic tissue of chick embryo limb buds. Ann. Med. Exp. Fenn. 44, 134-139 (1966)

ZWILLING, E.: Morphogenetic phases in development. Develop. Biol. Suppl. 2, 184-207 (1968)

Lebenslauf

Am 10. April 1956 wurde ich, Gerhard Reinhold Wetzig, als Sohn des Arztehepaares Dr. Siegfried Wetzig und Dr. Elfriede Wetzig, geborene Eichenauer, in Jugenheim an der Bergstraße geboren.

Von 1963 bis 1966 besuchte ich die Volksschule in Lindenfels/Odenwald und anschließend die Martin-Luther - Schule (Gymnasium) in Rimbach/Odenwald, an der ich am 14. April 1975 die Allgemeine Hochschulreife erlangte.

Vom 1. September 1975 bis 31. Dezember 1976 leistete ich Zivildienst im Pflegebereich der Städtischen Kliniken Darmstadt. Während dieser Zeit erhielt ich vom 9. Oktober 1975 bis 9. Oktober 1976 eine Ausbildung als Krankenpflegehelfer. Vom 1. Januar 1977 bis 30. April 1977 war ich als Krankenpflegehelfer weiter an diesem Krankenhaus tätig.

Im Sommersemester 1977 begann ich mit dem Studium der Physik an der Ruprecht-Karl-Universität Heidelberg. Zum Wintersemester 1977/78 wechselte ich zum Studium der Humanmedizin an das Rijksuniversitair Centrum te Antwerpen in Belgien. Ich setzte mein Studium in Deutschland im Wintersemester 1978/79 an der Universität des Saarlandes fort. Im Sommersemester 1979 wechselte ich zur Ruhr-Universität Bochum, wo ich am 18. März 1980 in Gelsenkirchen die Ärztliche Vorprüfung bestand. Ab Sommersemester 1980 studierte ich an der Eberhard-Karls - Universität in Tübingen. Dort legte ich am 26. März 1981 den ersten Abschnitt und am 18. März 1983 den zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab. Das praktische Jahr absolvierte ich am Städtischen Krankenhaus Friedrichshafen, wo ich am 9. April 1984 mit dem dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mein Medizinstudium abschloß.